

# **GELIFICAÇÃO TÉRMICA DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DE PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO**

**COMPORTAMENTO DE SISTEMAS AQUOSOS MISTOS PÉPTIDOS-POLISSACARÍDEOS**



**Duarte Paulo Martins Torres**

**GELIFICAÇÃO TÉRMICA DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DE  
PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO**

**COMPORTAMENTO DE SISTEMAS AQUOSOS MISTOS PÉPTIDOS-POLISSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Biológica da  
Universidade do Minho para a obtenção do grau de Mestre em  
Biotecnologia/Engenharia de Bioprocessos

BRAGA  
2005

Trabalho realizado sob orientação de

**Prof. Doutor José António Couto Teixeira**

Professor Catedrático do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho

e

**Prof. Doutora Maria do Pilar Figueroa Gonçalves**

Professora Associada do Departamento de Engenharia Química da Universidade do Porto

## RESUMO

De acordo com as estimativas mais recentes produzem-se mundialmente cerca de 286 milhares de toneladas de soro de leite por dia. O soro produzido diariamente pode providenciar, em média, 2,4 milhares de toneladas de proteínas que, potencialmente, podem satisfazer as necessidades proteicas diárias a cerca de 35 milhões de pessoas.

Durante muito tempo o soro foi encarado como um resíduo industrial ou produto com valor comercial residual. Só nas três últimas décadas foram desenvolvidos processos de separação que permitem obter ingredientes alimentares com alto teor proteico a partir do soro de leite.

As proteínas do soro de leite bovino estão entre as mais equilibradas fontes de aminoácidos da dieta humana; para além disso, foram já descritas muitas actividades biológicas, essenciais para o desenvolvimento harmonioso da cria, com repercussões benéficas também no ser humano. Muitas dessas propriedades estão encriptadas nas moléculas proteicas manifestando-se após proteólise que pode ocorrer durante o processo de digestão ou durante o processamento enzimático e/ou fermentativo. A tripsina, enzima seleccionada para o trabalho desenvolvido, revela-se uma enzima interessante para a libertação de péptidos bioactivos, dada a sua especificidade, mas também para o aumento da digestibilidade e diminuição da alergenicidade das proteínas do soro de leite bovino (capítulo 1).

As proteínas do soro podem ser usadas numa grande variedade de aplicações na indústria alimentar. Uma das funcionalidades das proteínas resulta da capacidade que possuem de responder a alterações ambientais alterando a sua conformação nativa e, por agregação, formar redes elásticas tridimensionais – gelificação. Os géis conferem estrutura, textura e estabilidade aos alimentos; possibilitam, ainda, a retenção de grandes quantidades de água e outras pequenas moléculas dentro da matriz alimentar (capítulo 2).

No capítulo 3 do trabalho que se apresenta, estudaram-se as alterações do comportamento reológico (a baixa deformação) que ocorrem durante o processo de

gelificação por aquecimento de suspensões de proteínas de soro, a pH neutro e força iónica de 220 mM. As propriedades reológicas dos géis finais foram estudadas em função da concentração de proteínas e do grau de hidrólise enzimática a que, previamente, as proteínas do soro de leite foram sujeitas. O aumento do grau de hidrólise reduz drasticamente a capacidade de gelificação das proteínas do soro e, ao contrário da variação da concentração, altera o balanço de forças que suportam a estrutura tridimensional do gel, provavelmente, diminuindo a contribuição das ligações covalentes e hidrofóbicas e aumentando a contribuição das pontes de hidrogénio.

No capítulo 4, estudaram-se as alterações do comportamento reológico que ocorrem durante o processo de gelificação por aquecimento de sistemas mistos de proteínas de soro (nativas ou hidrolisadas) e polissacarídeos neutros (galactomananos), a pH neutro e força iónica de 220 mM. Para os vários sistemas estudados, as propriedades reológicas dos géis finais foram estudadas em função da concentração de polissacarídeos. Recorrendo a técnicas microscópicas (microscopia óptica e microscopia confocal de varrimento laser), verificou-se que, da incompatibilidade termodinâmica entre os dois tipos de biopolímeros, resultou uma separação de fases do tipo segregativo. Este fenómeno, por ser simultâneo ao processo de gelificação, condiciona fortemente as propriedades reológicas dos géis, pois, se por um lado favorece a concentração da fase proteica gelificante, por outro, diminui a conectividade dessa mesma fase. A quantificação da massa de água (e solutos), excluída durante o processo de gelificação (sinérese), permitiu verificar que a presença de polissacarídeos diminui a severidade do fenómeno.

**Palavras-chave:** proteínas, péptidos, soro de leite bovino, hidrólise enzimática, tripsina, alimentos funcionais, géis, gelificação, reologia, microscopia óptica, microscopia confocal de varrimento laser, sinérese.

# ABSTRACT

Accordingly to the last estimates, the daily production of milk whey is about 286 thousand tons. The produced whey can provide 2.4 thousand tons of proteins that, potentially, can assure the daily protein requirements of about 35 million people.

In the past, whey was looked upon as an industrial residue or a low value product. Only in the last three decades separation processes were developed that allow the production of food ingredients with high protein content from milk whey.

Proteins from bovine milk whey are between the more equilibrated human dietary sources of amino acids; they have been described as possessing many essential biological activities which are important for the harmonious development of the calf and have also beneficial repercussions for humans. Many of these bioactivities are encrypted in the native protein molecules and are only revealed after proteolysis during the natural digestion process or during enzymatic and/or fermentative treatments. For this work, trypsin was selected to hydrolyse whey proteins since, due to its specificity, trypsin is an interesting enzyme for the liberation of bioactive peptides and, also, for the improvement of protein digestibility and for decreasing protein allergenicity (chapter 1). Whey proteins can be used for a wide range of industrial food applications. One of proteins functionalities results from their capacity to respond to changes in their physicochemical environment by modifying their native conformation and forming, after aggregation, tridimensional elastic networks – gelling. Gels confer structure, texture and stability to food products; they also allow the retention of large quantities of water and other small molecules inside the food matrix (chapter 2).

In the 3<sup>rd</sup> chapter of the present work, the changes in the rheological behaviour during the heat-induced gelling process of whey protein dispersions were studied by small deformation rheology (neutral pH and ionic force 220 mM). The rheological properties of the final gels were studied as a function of protein concentration and as a function of the degree of enzymatic hydrolysis. Hydrolysis reduces dramatically the gelling ability of whey proteins and alters the balance of the different forces that sustain the elastic

network, probably, increasing the proportion of hydrogen bonds and decreasing the proportion of covalent and hydrophobic interactions.

In the 4<sup>th</sup> chapter, the changes in the rheological behaviour during the heat-induced gelling process of mixed systems of whey proteins (native or hydrolysed) and neutral polysaccharides (galactomannans) were studied at neutral pH and ionic force 220 mM. The rheological properties of final gels were studied as a function of polysaccharide concentration. Using microscopic techniques (optical microscopy and confocal laser scanning microscopy), thermodynamic incompatibility between the two polymers, inducing segregative phase separation, was observed. When phase separation and gelling processes occur simultaneously the rheological properties of mixed gels are greatly influenced because phase separation favours the protein gelling phase concentration but, at the same time, decreases its connectivity. The quantification of the water (and solutes) excluded during the gelling process (syneresis) permits to verify that, when polysaccharide is present during the gelling process, syneresis is less severe.

**Keywords:** proteins, peptides, bovine milk whey, enzymatic hydrolysis, trypsin, functional foods, gels, gelling, rheology, optical microscopy, confocal laser scanning microscopy, syneresis.



## *AGRADECIMENTOS*

*À Professora Doutora Maria do Pilar Figueroa Gonçalves, pela confiança depositada, pelo apoio e acompanhamento científico demonstrados durante a realização de todo o trabalho, o meu muito obrigado.*

*Ao Professor Doutor José António Couto Teixeira, pela confiança depositada e, sobretudo, por alargar os meus horizontes científicos e profissionais, o meu muito obrigado.*

*Ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, e ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho pela disponibilização das condições materiais necessárias ao desenvolvimento do trabalho experimental.*

*Ao Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto pela disponibilização das condições necessárias à execução das análises cromatográficas.*

*Ao Instituto de Ciências e Tecnologia Agrárias e Agro-Alimentares que, no âmbito do projecto POCTI/QUI/36452/2000, suportado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, me concedeu uma bolsa de investigação.*

*À Cristina Rocha pela produção dos hidrolisados enzimáticos e à Virgínia Mota pela execução de grande parte das análises cromatográficas, o meu muito obrigado.*

*Aos meus colegas de laboratório, Wancheng Sittikijyothin, Luís Lopez, Marta Vazquez e Loïc Hilliou pela companhia, boa disposição e colaboração.*

*Um agradecimento muito sentido aos meus pais por terem possibilitado que eu, em alguma altura da minha vida, pudesse ambicionar executar um trabalho desta natureza. Às minhas duas irmãs pela participação amiga que tiveram neste projecto, o meu muito obrigado.*

*Um agradecimento, muito especial, à Andreia, pelo incondicional apoio e pelo carinho que dela recebi em todos os momentos da elaboração deste trabalho.*

# ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
AGRADECIMENTOS	v
ÍNDICE	vii
NOMENCLATURA	xi

<b>CAPÍTULO 1 - Proteínas do soro de leite bovino</b>	<b>1</b>
1.1 O soro de leite bovino	1
1.1.1 Definição e produção	1
1.1.2 Composição e processamento	2
1.2 As proteínas do soro	6
1.2.1 Ocorrência, propriedades físico-químicas e funções biológicas	6
$\beta$ -lactoglobulina	7
$\alpha$ -lactalbumina	7
Imunoglobulinas	8
Albumina do soro	8
Lactoferrina	8
Lactoperoxidase	9
Glicomacropéptido	9
Proteose peptonas	10
Lisozima	10
Factores de crescimento	10
1.3 O soro bovino na biologia e na nutrição humana	10
1.3.1 As proteínas e os seus aminoácidos	10
1.3.2 As proteínas e os seus péptidos	12
1.4 Hidrólise enzimática das proteínas do soro	13
1.4.1 Obtenção de péptidos bioactivos	13
1.4.2 Melhor digestibilidade, menor alergenicidade	17
1.4.3 Análise e fraccionamento dos hidrolisados proteicos	18
1.5 O soro de leite – desenvolvimento de alimentos funcionais	19
1.6 Bibliografia	21

<b>CAPÍTULO 2 - Proteínas do soro de leite bovino - Gelificação e géis</b>	<b>27</b>
2.1 Propriedades funcionais das proteínas do soro	27
2.1.1 Gelificação das proteínas do soro	28
2.2 Estudo da gelificação e dos géis	29
2.2.1 Reologia	31
2.2.1.1 Ensaio oscilatório	31
2.2.1.2 Reologia dos géis de proteínas do soro de leite	33
2.2.1.2.1 Variação do módulo elástico em função da concentração – modelos escalares	33
2.2.2 Capacidade de retenção de água	34
2.3 Hidrólise enzimática vs gelificação	35
2.4 Misturas proteína/polissacarídeo	36
2.4.1 Galactomananos	38
2.4.2 Estudo microscópico dos géis mistos	39
2.5 Bibliografia	39
 <b>CAPÍTULO 3 - Estudo da gelificação de proteínas de soro de leite</b>	 <b>45</b>
3.1 Materiais	45
3.2 Métodos experimentais	46
3.2.1 Caracterização das amostras	46
3.2.1.1 Teor em humidade e resíduo seco	46
3.2.1.2 Teor em cinzas	46
3.2.1.3 Teor em proteínas	46
3.2.1.4 Análise cromatográfica dos preparados proteicos	46
3.2.2 Hidrólise enzimática do CPS80	47
3.2.3 Estudo da gelificação	47
3.2.3.1 Preparação das dispersões proteicas	47
3.2.3.2 Ensaio reológico	47
3.2.3.3 Estatística	48
3.3 Resultados	49
3.3.1 Caracterização das amostras	49
3.3.2 Hidrólise enzimática do CPS80	49

3.3.3 Ensaio reológico - Estudo da gelificação do CPS80	51
3.3.3.1 Esquema geral	51
3.3.3.2 Gelificação do CPS80 – efeito da concentração de proteína	54
3.3.4 Ensaio reológico - Estudo da gelificação dos hidrolisados trípticos	60
3.3.4.1 Planeamento experimental	60
3.3.4.2 Aplicação do desenho experimental	62
3.4 Algumas conclusões	73
3.5 Bibliografia	74
 <b>CAPÍTULO 4 - Estudo da gelificação de sistemas mistos</b>	 <b>77</b>
4.1 Materiais	77
4.2 Métodos experimentais	77
4.2.1 Caracterização das amostras	77
4.2.1.1 Determinação da razão manose/galactose da goma de tara	78
4.2.1.2 Determinação da viscosidade intrínseca da goma de tara	78
4.2.1.3 Determinação da massa molecular média viscosimétrica	78
4.2.2 Estudo da gelificação	79
4.2.2.1 Preparação das soluções de goma de tara	79
4.2.2.2 Preparação das misturas de proteínas de soro/goma de tara	79
4.2.2.3 Ensaio reológico	80
4.2.2.4 Microscopia	80
4.2.2.5 Sinérese	81
4.3 Resultados	81
4.3.1 Caracterização das amostras	81
4.3.2 Ensaio reológico	82
4.3.3 Microestrutura	90
4.3.4 Sinérese	96
4.4 Algumas conclusões	97
4.5 Bibliografia	98
 <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	 <b>99</b>



## Nomenclatura (símbolos)

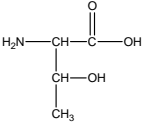

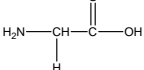
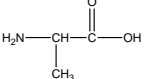
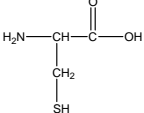
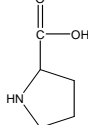
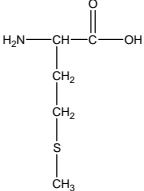
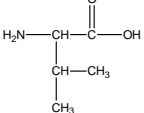
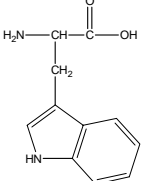
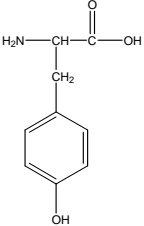
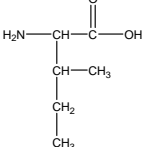
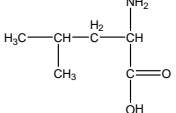
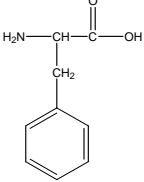
$A$	Área	$m^2$
$C$	concentração mássica	(%, p/p)
$C_0$	concentração crítica de gelificação	(%, p/p)
$F$	Força	(N)
$G$	módulo de corte	(Pa)
$G'$	módulo de conservação ou elástico	(Pa)
$G''$	módulo de dissipação ou viscoso	(Pa)
$G^*$	módulo complexo dinâmico	(Pa)
$I$	força iónica	(mM)
$M$	massa molecular	(Da)
$M_v$	massa molecular média viscosimétrica	(Da)
$T$	Temperatura	(°C)
$T_d$	temperatura de desnaturação	(°C)
$k'$	constante de Huggins	adimensional
$k''$	constante de Kraemer	adimensional
$t$	Tempo	(s, min ou h)
$t_g$	tempo de gelificação	(s, min ou h)
$\delta$	desfasamento (ângulo de dissipação)	(rad)
$\gamma$	Deformação	adimensional
$\gamma^*$	deformação complexa	adimensional
$\gamma_c$	deformação crítica de ruptura do gel	adimensional
$\eta$	viscosidade	(Pa.s)
$[\eta]$	viscosidade intrínseca ou número de viscosidade limite	(dL/g)
$\eta_{ap}$	viscosidade aparente	(Pa.s)
$\eta_{esp}$	viscosidade específica	adimensional
$\eta_r$	viscosidade relativa	adimensional
$\eta_{red}$	viscosidade reduzida	(dL/g)
$\sigma$	tensão de corte	(Pa)
$\sigma^*$	tensão de corte complexa	(Pa)
$\omega$	frequência de oscilação	(rad.s <sup>-1</sup> )

# Nomenclatura dos aminoácidos

(ordenados segundo a hidrofobicidade da molécula, de forma crescente)

Nome	Código		Estrutura	Hidrofobicidade
	3 letras	1 letra		
Arginina	Arg	R	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{NH} \\    \\  \text{C}=\text{NH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $	
Ácido aspártico	Asp	D	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C}=\text{O} \\    \\  \text{OH}  \end{array}  $	
Ácido glutâmico	Glu	E	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C}=\text{O} \\    \\  \text{OH}  \end{array}  $	
Histidina	His	H	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{N} \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{C} \quad \text{C} \\  \diagdown \quad \diagup \\  \text{H} \quad \text{H}  \end{array}  $	
Aspargina	Asn	N	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C}=\text{O} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $	
Glutamina	Gln	Q	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C}=\text{O} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $	
Lisina	Lys	K	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $	
Serina	Ser	S	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{OH}  \end{array}  $	



<b>Treonina</b>	Thr	T		<div>Hidrofobicidade</div> 
<b>Glicina</b>	Gly	G		
<b>Alanina</b>	Ala	A		
<b>Cisteína</b>	Cys	C		
<b>Prolina</b>	Pro	P		
<b>Metionina</b>	Met	M		
<b>Valina</b>	Val	V		
<b>Triptofano</b>	Trp	W		
<b>Tirosina</b>	Tyr	Y		
<b>Isoleucina</b>	Ile	I		
<b>Leucina</b>	Leu	L		
<b>Fenilalanina</b>	Phe	F		



# CAPÍTULO 1

## Proteínas do soro de leite bovino

### Propriedades biológicas e nutricionais

### Hidrólise enzimática

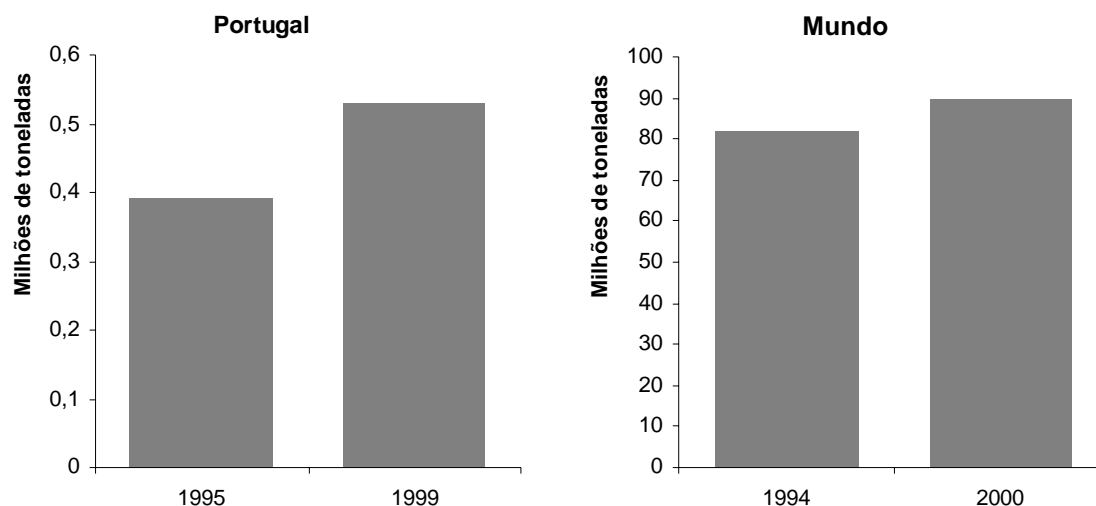
## 1.1 O soro de leite bovino

### 1.1.1 Definição e produção

O soro de leite é o líquido que escorre da coalhada durante a precipitação da caseína do leite. Do ponto de vista industrial, existem dois tipos de soro de leite; soro ácido ( $\text{pH} < 5,1$ ) e soro doce ( $\text{pH} > 5,6$ ).

O soro ácido é o subproduto do fabrico de caseína alimentar ou queijo fresco, resultado da acidificação do leite com adição directa de ácido, ou por produção *in situ* de ácido através de fermentação láctica, respectivamente. O soro doce, subproduto da produção de queijo, é obtido após o tratamento do leite com quimosina; esta enzima ataca especificamente a  $\kappa$ -caseína libertando o polipéptido C-terminal de 64 aminoácidos que aparece no soro doce, o glicomacropéptido (Mulvihill e Donovan 1987).

A produção de soro de leite aumentou durante a década de 90, quer a nível nacional, quer a nível mundial (figura 1.1). A sua produção está, logicamente, associada ao fabrico de queijo sendo produzidos 9 a 11 kg de soro por cada kg de queijo (McIntosh *et al.* 1998; TECNINVEST 2000).



**Figura 1.1** Produção anual de soro líquido em Portugal e no mundo, na última década

### 1.1.2 Composição e processamento

Na composição do soro aparece mais de 99% da lactose do leite, cerca de 20% das proteínas (tabela 1.1) e grande parte das vitaminas hidrossolúveis e minerais. Estes componentes são responsáveis pela alta putrescibilidade do soro de leite, propriedade que, em termos ambientais, torna exigível um sistema integrado de tratamento deste subproduto (Smithers *et al.* 1996).

**Tabela 1.1** Composição típica do leite e do soro de leite  
(Smithers *et al.* 1996; TECNINVEST 2000)

	Leite g/100g	Soro g/100g
Proteína	3,6	0,65 - 1,05
Gordura	3,7	0,05 - 0,63
Cinzas	0,7	0,37 - 0,95
Lactose	4,9	4,5 - 5,3
Sólidos totais	12,8	6,2 - 7,3

Tradicionalmente, o soro de leite foi visto como um resíduo sem qualquer valor comercial, descarregado em cursos de água ou incorporado em rações para animais. Esta abordagem está a ser abandonada e, dadas as suas excelentes propriedades funcionais e nutricionais, cada vez mais o soro de leite é tratado como um produto com elevado valor acrescentado.

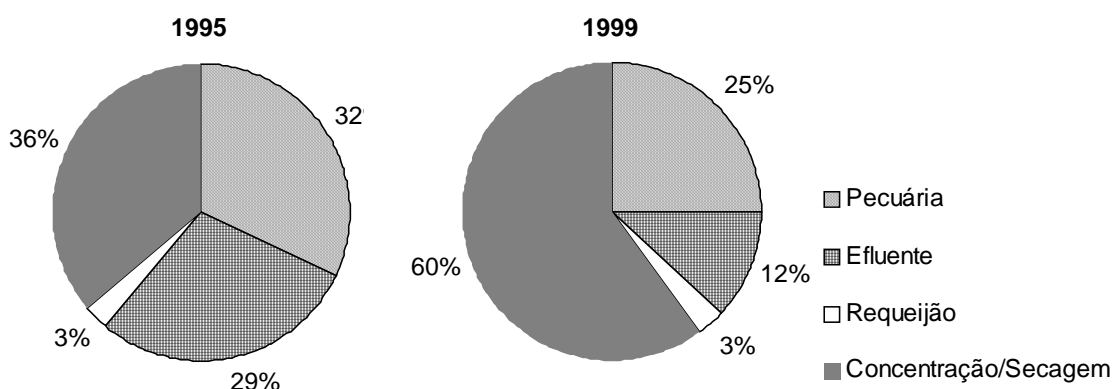
Numa primeira fase, o soro pode ser concentrado por aquecimento e evaporação de parte da água ou, mais frequentemente, por osmose reversa (OR, figura 1.3). Esta etapa intermédia ocorre normalmente na unidade de fabrico de queijo. O soro concentrado

obtido tem custos de transporte reduzidos e pode ser, de forma mais económica, encaminhado para uma nova unidade de tratamento. O soro pode também servir de base para o fabrico do requeijão (Malcata 1999; TECNINVEST 2000) ou reincorporado na coalhada (Hinrichs 2001).

Recorrendo à secagem por atomização obtém-se o soro em pó. Este ingrediente, já tradicional da indústria alimentar, com cerca de 13% de proteína, representa a 1ª geração de produtos resultantes da valorização do soro de leite (Huffman e Harper 1999).

A desmineralização por electrodialise e/ou deslactação por cristalização da lactose são processos que permitem obter produtos de maior valor acrescentado para aplicações alimentares específicas.

A situação do aproveitamento do soro em Portugal é apresentada na figura 1.2. De referir que a fracção de soro concentrada e seca quase duplicou de 1995 para 1999. No entanto uma fracção ainda considerável era, em 1999, despejada nos cursos de água.



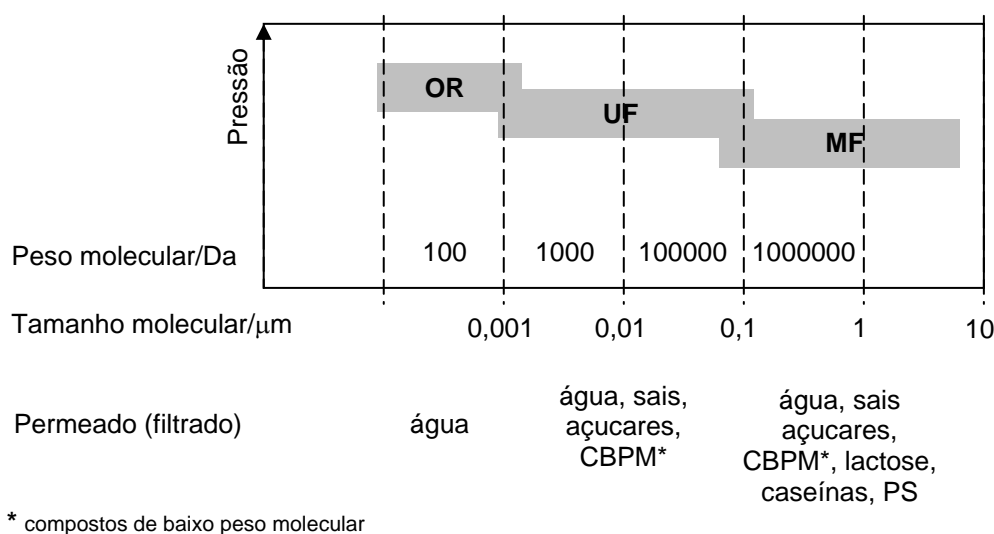
**Figura 1.2** Destino do soro líquido em Portugal nos anos 90 (TECNINVEST 2000)

Desde a primeira metade do século XX que se tentaram desenvolver tecnologias capazes de concentrar ou separar em larga escala os componentes mais interessantes do soro de leite do ponto de vista nutricional e tecnológico: as proteínas.

A partir de 1940, surge no mercado internacional um produto derivado do soro com alto teor proteico, a lactalbumina (não confundir com  $\alpha$ -lactalbumina que é uma das proteínas do soro), obtido através de uma desnaturação a quente das proteínas e consequente precipitação a pH controlado. Nas três últimas décadas, desenvolveram-se processos que permitem obter produtos com alto teor em proteínas nativas, preservando assim as suas propriedades intrínsecas: os concentrados de proteínas de soro (CPS) e os isolados de proteínas do soro (IPS) (Huffman e Harper 1999).

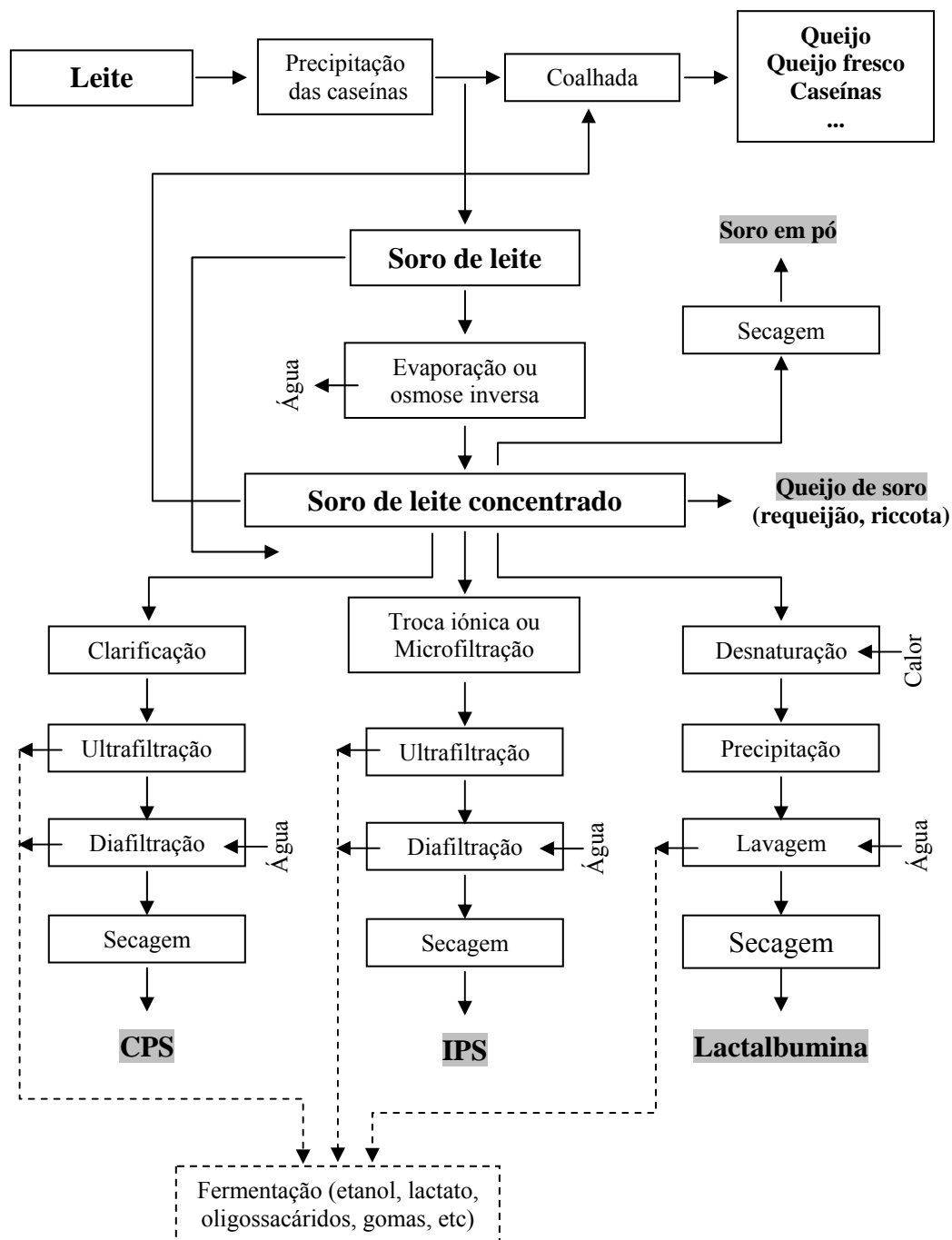
Os processos desenvolvidos são essencialmente processos que usam membranas semi-permeáveis e a pressão como força directriz. Neste tipo de processos, a separação dos componentes do soro é baseada, essencialmente, no tamanho molecular dos compostos (figura 1.3) (Lewis 1996). A produção dos ingredientes proteicos combina, essencialmente, três processos membranares, a osmose reversa (OR, já referida no contexto da concentração do soro), a ultrafiltração (UF) e a microfiltração (MF) (figura 1.4) (Huffman e Harper 1999; Lewis 1996). A diafiltração (DF) é um processo de UF onde o retido é diluído com água e recirculado no sistema de filtração permitindo obter produtos com maior concentração de proteínas (figura 1.4).

Na cromatografia de troca iónica, usada na produção de IPS, a separação baseia-se na carga electrostática e no carácter anfotérico das proteínas. O soro, normalmente a pH baixo, é conduzido por um suporte sólido carregado negativamente, aí ocorre a adsorção das proteínas que, depois da eluição dos compostos não ligados, aumentando o pH, são recuperadas com um novo solvente (Grandison 1996).



**Figura 1.3** Diagrama dos diferentes processos membranares adaptado de (Lewis 1996; Malcata 1999)

Em Portugal, até 1999, o aproveitamento do soro para a produção de ingredientes proteicos era inexistente. Na altura encontravam-se em fase de planeamento e arranque quatro projectos nesse sentido (TRISORO, LUSOSOR, ECO-SOROS e QUEIJOS TAVARES) que, no seu conjunto, previam a valorização de, aproximadamente (por defeito), 220 mil toneladas de soro de leite por ano, cerca de 50% da produção nacional (TECNINVEST 2000).



**Figura 1.4** Diagrama geral do aproveitamento do soro - fabrico de ingredientes proteicos  
Adaptado de (Huffman e Harper 1999; Malcata 1999)

No caso dos CPS, existem no mercado produtos em que a concentração de proteínas varia entre 34 e 85%. Na denominação comercial é referido o teor aproximado de proteínas, assim o produto CPS80 terá um teor em proteínas próximo de 80%. Os IPS têm, por norma, concentrações superiores e, em muitos casos, acima dos 90% (Huffman

e Harper 1999). A composição de alguns preparados proteicos (CPS80 e IPS), existentes no mercado americano e europeu, são apresentadas na tabela 1.2; nota-se uma considerável variabilidade na composição que pode ser explicada pelas diferenças na composição inicial do soro, que depende da composição do leite e, sobretudo, dos processos de obtenção de queijo ou caseínas (de la Fuente *et al.* 2002).

**Tabela 1.2** Composição de CPS e IPS do mercado internacional (Holt *et al.* 1999; Morr e Foegeding 1990)

	Composição aproximada (% p/p)					pH
	Proteína	Lactose	Gordura	Cinzas	Humidade	
<b>CPS80</b>	71,9-76,6	2,1-13,4	0,3-7,4	2,5-6,0	3,8-6,0	6,2-7,0
<b>IPS</b>	83,2-92,7	0,1-0,5	0,2-0,7	1,4-4,2	2,4-5,6	6,9-7,4

## 1.2 As proteínas do soro

### 1.2.1 Ocorrência, propriedades físico-químicas e funções biológicas

O soro bovino contém uma mistura de várias proteínas (tabela 1.3). São, na sua maioria, proteínas globulares e daí resultam muitas das suas propriedades funcionais. Algumas das suas funções biológicas estão identificadas, outras emergem, outras... estarão ainda por descobrir.

A concentração dos constituintes do leite varia ao longo do ciclo de lactação dos mamíferos. No caso das proteínas do soro, não só a concentração total varia, como varia também a concentração individual de cada proteína (McManaman e Neville 2003; Schanbacher *et al.* 1997; Simpson e Nicholas 2002).

Serão abordados alguns aspectos biológicos e estruturais das principais proteínas do soro bovino nos próximos parágrafos.

**Tabela 1.3** Comparação da composição proteica do soro bovino com o leite humano

	Proteínas (% p/p)	
	Leite humano	Soro bovino
β-lactoglobulina	-	0,2-0,4
α-lactalbumina	0,19 (Shah 2000)	0,06-0,17 (Huffman e Harper 1999; Mulvihill e Donovan 1987)
Albumina do soro	0,04 (Shah 2000)	0,04-0,05
Imunoglobulinas	0,13 (Shah 2000)	0,07-0,10 (Korhonen <i>et al.</i> 2000)
Glicomacropéptido	-	0,10-0,20 (Brody 2000)
Lactoferrina	0,1-0,6 (Kanyshkova <i>et al.</i> 2001)	0,002-0,02 (Steijns e Van Hooijdonk 2000)
Lactoperoxidase	-	~0,003 (Kussendrager e Van Hooijdonk 2000)
Lisozima	0,01-0,04 (Shah 2000)	~0,00004 (Korhonen <i>et al.</i> 1998)
Proteose peptona	-	0,06-0,18 (Mulvihill e Donovan 1987)
Outras	0,11	0,08



### ***β-lactoglobulina***

A β-lactoglobulina é a principal proteína do soro do leite dos ruminantes (~50%) mas está ausente no leite humano e de outros animais monogástricos (Mulvihill e Donovan 1987). Esta proteína pertence à superfamília das lipocalinas, um grupo de pequenas proteínas extracelulares que, dada a sua composição e conformação, se ligam a pequenas moléculas hidrofóbicas (Koistinen *et al.* 1999). A β-lactoglobulina liga-se fortemente ao retinol (vitamina A) e já foi sugerido que é responsável pelo transporte desta vitamina ao longo do tracto digestivo do recém-nascido (Simpson e Nicholas 2002).

A β-lactoglobulina tem na sua estrutura primária 162 aminoácidos (figura 1.5 página 15), ponto isoeléctrico de 5,2 e peso molecular de ~18,3 kDa (Mulvihill e Donovan 1987). Possui cinco resíduos de cisteína, quatro estão envolvidos em duas ligações dissulfureto entre os resíduos de cisteína (106-119) e (66-160) que contribuem para a estrutura terciária da proteína. Existem várias variantes genéticas desta proteína sendo as mais comuns a variante A e a B. Diferem nos resíduos 64-aspartato e 118-valina na β-lactoglobulina A, ocupados, respectivamente, pela glicina e pela alanina na β-lactoglobulina B.

Em solução, com pH entre 3,5 e 5,2, a β-lactoglobulina associa-se para formar octâmeros. Quando o pH é superior ao ponto isoeléctrico (5,2) a forma predominante passa a ser a dimérica. Finalmente, quando  $3,5 > \text{pH} > 6,5$  as formas multiméricas começam a dissociar-se devido a repulsões electrostáticas (Pessen *et al.* 1985).

### ***α-lactalbumina***

A α-lactalbumina é uma pequena e compacta metaloproteína (~14,1 kDa) com 123 aminoácidos (figura 1.6 página 16) e representa cerca de 25% das proteínas do soro bovino. É uma proteína com forte afinidade para o  $\text{Ca}^{2+}$  e outros catiões que, em maior ou menor grau, modulam a sua estrutura, estabilidade e função. Biologicamente, integra o complexo enzimático da sintetase da lactose que cataliza a reacção final da biossíntese da lactose no aparelho de Golgi das células epiteliais da glândula mamária. O segundo componente do complexo enzimático, uma transferase de resíduos glicosil, está envolvido no processamento pós-traducional das proteínas em várias células secretoras, transferindo grupos galactosil da uridina difosfato de galactose (UDP-galactose) para

glicoproteínas contendo N-acetilglicosamina. Na glândula mamária, a interacção da  $\alpha$ -lactalbumina com a transferase de resíduos glicosil aumenta a afinidade desta última para a glicose catalizando assim a reacção seguinte (Permyakov e Berliner 2000):



### ***Imunoglobulinas***

As imunoglobulinas (Igs) ou anticorpos são produzidas pelos linfócitos B. Na sua estrutura, possuem uma ou mais unidades básicas compostas por duas cadeias leves (23 kDa) e duas cadeias pesadas (53 kDa). No leite bovino, existem essencialmente três classes de Igs: IgG, IgM e IgA. Embora com funções próprias são, globalmente, proteínas que se ligam de forma específica ao agente invasor (antigénio) mediando dessa forma a resposta imunológica. Previnem ainda a adesão dos microorganismos às superfícies, aglutinam os microorganismos e inibem o seu metabolismo e toxinas (Korhonen *et al.* 2000).

Na vaca, durante as últimas semanas de gravidez, ocorre a acumulação selectiva de Igs a partir do sangue para o colostro. As Igs nos primeiros 2 dias de lactação podem atingir os 200 g.l<sup>-1</sup> no colostro (70 a 80% do total de proteínas) caindo a sua concentração, abruptamente, para valores entre 0,7 e 1,0 g.l<sup>-1</sup> no leite maduro (Korhonen *et al.* 2000).

### ***Albumina do soro***

Tal como as imunoglobulinas, a albumina do soro acumula-se no leite a partir do soro sanguíneo. Sabe-se que esta proteína se liga aos ácidos gordos mas não se conhecem funções biológicas específicas (Walzem *et al.* 2002). Trata-se de uma proteína com 582 aminoácidos e um peso molecular aproximado de 66,3 kDa. Possui 17 ligações dissulfureto que estabilizam a sua estrutura terciária. Esta proteína atinge o seu ponto isoeléctrico a pH 4,8 (Mulvihill e Donovan 1987).

### ***Lactoferrina***

A lactoferrina é sintetizada pelos neutrófilos, possui uma cadeia de 689 aminoácidos e um peso molecular de ~ 80,0 kDa. Esta glicoproteína está presente, para além do leite, nas secreções das glândulas exócrinas da entrada do aparelho digestivo, respiratório e reprodutor bem como no sangue, lágrimas e liquido sinovial. Esta localização sugere

que esta proteína está envolvida na primeira linha de defesa contra patogénicos invasores (Simpson e Nicholas 2002; Steijns e Van Hooijdonk 2000).

A lactoferrina tem um ponto isoeléctrico de 9,4. A sua alta afinidade pelo ferro e a capacidade de ligação da sua extremidade N-terminal fortemente catiónica são características estruturais responsáveis pelas várias actividades biológicas apontadas por Steijns e van Hooijdonk (2000) na sua revisão sobre a ocorrência, propriedades bioquímicas e características tecnológicas da lactoferrina bovina.

### ***Lactoperoxidase***

A lactoperoxidase pertence à família das peroxidases, um grupo de enzimas largamente distribuídas na natureza. As reacções oxidativas que cataliza, em que o peróxido de hidrogénio é sempre um dos reagentes, originam espécies reactivas com actividade anti-microbiana (Kussendrager e Van Hooijdonk 2000).

Em termos estruturais, trata-se de uma cadeia polipeptídica de 612 aminoácidos com um peso molecular de 78,4 kDa. Tal como a lactoferrina, é uma proteína básica, o seu ponto isoeléctrico é de 9,6. Kussendrager e van Hooijdonk (2000), na sua revisão sobre a lactoperoxidase, realçam a aplicação deste composto como um anti-microbiano natural em produtos alimentares e não alimentares.

### ***Glicomacropéptido***

A hidrólise da  $\kappa$ -caseína do leite durante o fabrico do queijo, reacção catalisada pela quimosina, liberta a *para*- $\kappa$ -caseína que permanece na coalhada e um péptido terminal de 64 aminoácidos (8 kDa) com cerca de 10% do seu peso em sacarídeos, que escorre com o soro, o glicomacropéptido (GMP, também designado por caseinomacropéptido ou caseinoglicomacropéptido). Este péptido (figura 1.7 página 16), inexistente no soro ácido, representa cerca de 15 a 20% do total das proteínas do soro doce (Brody 2000). O GMP é também libertado no estômago por acção da pepsina gástrica sobre a  $\kappa$ -caseína após a ingestão de leite ou iogurte (Ledoux *et al.* 1999).

Na sua revisão sobre as actividades biológicas do glicomacropéptido, Brody (2000), destaca a protecção contra toxinas, bactérias, vírus e regulação do sistema imune como as áreas mais promissoras no estudo deste péptido.

### ***Proteose peptonas***

Andrews e Alichanidis identificaram 38 péptidos da fracção das proteínas do soro resistentes ao aquecimento (95-100 °C durante 30 min) e insolúveis em ácido tricloroacético (8 a 12%), características químicas que definem as proteose peptonas. Muitos destes péptidos resultam da proteólise das caseínas, nomeadamente da  $\beta$ -caseína, por acção de proteínases ou da plasmina do leite (Andrews e Alichanidis 1983; Mulvihill e Donovan 1987).

### ***Lisozima***

A lisozima (~15 kDa) é uma enzima que cataliza a hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico e a 2-acetilamino-2-desoxi-D-glucose, componentes da parede celular das bactérias, promovendo a lise celular (Shah 2000).

### ***Factores de crescimento***

Nas últimas duas décadas, o estudo da fracção proteica do leite bovino revelou a existência de vários componentes directamente envolvidos na manutenção, reparação e proliferação celulares. Estas proteínas de baixo peso molecular, denominadas factores de crescimento, interagem com receptores específicos da membrana celular. Depois de internalizadas, desencadeiam uma resposta celular no sentido do aumento da actividade biossintética, o que leva ao crescimento, diferenciação e proliferação celular. É actualmente aceite que estes componentes estão envolvidos na maturação dos órgãos imaturos do recém-nascido. Estas propriedades estão a levar ao desenvolvimento de estratégias para a concentração dos factores de crescimento do soro bovino para uso clínico, nomeadamente, na recuperação de tecidos danificados, quer em tratamentos pós cirúrgicos quer na cicatrização de feridas através de aplicação tópica (Francis *et al.* 1995; Regester e Belford 1999).

## **1.3 O soro bovino na biologia e na nutrição humana**

### ***1.3.1 As proteínas e os seus aminoácidos***

O valor nutricional das proteínas da dieta é uma função da sua composição em aminoácidos essenciais, da sua digestibilidade e, finalmente, do seu posterior

metabolismo (Bos *et al.* 2000). As quantidades de referência de aminoácidos essenciais foram revistas em 1990 pela FAO/WHO (Food and Agriculture Organization e World Health Organization) que estabeleceu dois padrões de necessidades (Tabela 1.4): um para crianças com menos de 2 anos, que corresponde à composição do leite humano; e um outro padrão, para as idades seguintes, obtido com base na taxa de oxidação de aminoácidos em função dos níveis ingeridos (FAO/WHO 1990).

As proteínas do soro do leite têm, no seu conjunto, um perfil em aminoácidos próximo dos padrões de necessidades recomendados. À sua composição associa-se a sua boa digestibilidade o que faz com que o valor biológico destas proteínas seja alto quando comparado com outras proteínas alimentares.

Uma das particularidades das proteínas do soro é a sua riqueza em aminoácidos com enxofre na cadeia lateral (metionina e cisteína). A cisteína é o aminoácido que limita a síntese intracelular de glutathione, um tripéptido (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina) envolvido em mecanismos antioxidantes, cuja concentração diminui quando a concentração de espécies reactivas de oxigénio aumenta, nomeadamente, nas células musculares em situações de exercício físico intenso e nos linfócitos durante o desenvolvimento da resposta imune. O trabalho desenvolvido por Bounous e seus colaboradores ao longo das últimas duas décadas demonstra que a concentração tecidual de glutathione é significativamente aumentada pela ingestão de proteínas do soro. Esta acção está directamente envolvida na actividade promotora da resposta imune e na actividade anticancerígena demonstrada pelas proteínas do soro em estudos com animais (Bounous 2000; Bounous *et al.* 1989).

De todas as proteínas alimentares, as do soro apresentam a maior concentração em aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina). Estes aminoácidos são importantes constituintes das proteínas musculares. Estão descritos estudos onde a suplementação nutricional com este tipo de aminoácidos em desportistas previne a degradação proteica e a perda de massa muscular associada ao exercício intenso e de longa duração (Walzem *et al.* 2002).

Markus e colaboradores demonstraram ainda que uma dieta contendo proteínas do soro enriquecidas em  $\alpha$ -lactalbumina como fonte proteica altera a razão plasmática de (triptofano)/(outros aminoácidos neutros) o que modula a actividade serotoninérgica cerebral. Esta acção promove a melhoria do humor e o aumento das capacidades cognitivas em humanos vulneráveis ao stress (Markus *et al.* 2002; Markus *et al.* 2000).

**Tabela 1.4** Comparação da composição das proteínas do soro com a composição ideal das proteínas para a satisfação das necessidades em aminoácidos de crianças e adultos.

	Necessidades (g/100g proteína) <sup>(a)</sup>		Composição g/100g proteína <sup>(b)</sup> (aminoácido na proteína/necessidade do aminoácido, > 2 anos)											
	< 2 anos	> 2 anos	Proteínas											
			Proteínas do soro		Proteínas isoladas*									
					$\beta$ -LG	$\alpha$ -LA	LCF	ALB	GMP					
His	2,6	1,9	2,1	(1,1)	1,7 (0,89)	3,3 (1,8)	1,9 (1,0)	4,0 (2,1)	0,0 (0)					
Lys	6,6	5,8	9,4	(1,6)	12,0 (2,1)	12,5 (2,2)	9,9 (1,7)	13,0 (2,2)	5,5 (0,95)					
Thr	4,3	3,4	7,2	(2,1)	6,5 (1,9)	6,8 (2,0)	5,4 (1,6)	5,9 (1,7)	17,9 (5,3)					
Val	5,5	3,5	5,8	(1,7)	6,1 (1,7)	5,0 (1,4)	6,7 (1,9)	6,4 (1,8)	8,8 (2,5)					
Trp	1,7	1,1	1,4	(1,3)	1,1 (1,0)	5,8 (5,3)	3,3 (3,0)	0,6 (0,56)	0,0 (0)					
Ile	4,6	2,8	5,9	(2,1)	7,2 (2,6)	7,5 (2,7)	2,6 (0,94)	2,8 (0,99)	9,8 (3,5)					
Leu	9,3	6,6	9,6	(1,5)	15,8 (2,4)	12,2 (1,9)	10,8 (1,6)	12,1 (1,8)	1,6 (0,25)					
Phe+Tyr	7,2	6,3	5,9	(0,93)	5,6 (0,89)	8,7 (1,4)	10,3 (1,6)	12,2 (1,9)	0,0 (0)					
Met+Cys	4,2	2,5	4,1	(1,6)	6,6 (2,6)	8,0 (3,2)	5,9 (2,4)	7,3 (2,9)	1,9 (0,75)					
VB <sup>(c)</sup>				0,93	0,89	1,0	0,94	0,56	0					

<sup>(a)</sup> (FAO/WHO 1990)

<sup>(b)</sup> No caso do soro a composição em aminoácidos foi calculada como a média dos teores apresentados por Calbet and Holst, 2004 (Calbet e Holst 2004); a composição em aminoácidos de cada proteína foi calculada de acordo com a fórmula: nº unidades presente na sequência primária da proteína x peso molecular do aminoácido/peso molecular da proteína x 100.

<sup>(c)</sup> Valor biológico: azoto retido/azoto absorvido (por definição VB <1), reflecte o balanço dos aminoácidos essenciais da proteína digerida absorvida (Bos *et al.* 2000; Hoffman e Falvo 2004). Na tabela, o valor biológico foi definido como a menor razão da concentração do aminoácido na proteína/necessidade do aminoácido para idades superiores a 2 anos. Considerou-se a digestibilidade  $\approx$  1.  $\beta$ -LB,  $\beta$ -lactoglobulina;  $\alpha$ -LA,  $\alpha$ -lactalbumina; LCF, lactoferrina; ALB, albumina; GMP, glicomacropéptido.

### 1.3.2 As proteínas e os seus péptidos

Do ponto de vista evolucionista, o leite sofreu uma forte pressão selectiva já que, por si só, assegura o sucesso da prole. É aceite que o leite possui componentes que exercem funções que transcendem a essencialidade nutricional (Walzem *et al.* 2002). No soro, são muitas as actividades biológicas apontadas às suas proteínas. De uma forma global, as proteínas do soro regulam o desenvolvimento e maturação harmoniosa dos órgãos; participam directa ou indirectamente na resposta imunológica; actuam a nível intestinal, participando na eliminação de resíduos; e possuem actividade anticancerígena (McIntosh *et al.* 1998; Schanbacher *et al.* 1997; Walzem *et al.* 2002).

Muitas das funções biológicas apontadas às proteínas do soro (e às caseínas) só se manifestam após a sua proteólise durante o processo digestivo ou durante o processamento. São, na realidade, alguns dos péptidos encriptados nas sequências proteicas originais que actuam a nível celular e aí exercem funções reguladoras de vários processos orgânicos. São várias as revisões gerais sobre as bioactividades dos péptidos do leite inteiro encontradas na literatura (Clare e Swaisgood 2000; Korhonen e

Philanto-Leppälä 2001; Meisel 1997; Meisel *et al.* 1989; Philanto-Leppälä 2001; Schanbacher *et al.* 1997; Shah 2000) e outras que abordam especificamente as bioactividades dos péptidos das proteínas do soro (Korhonen *et al.* 1998). As acções biológicas atribuídas aos péptidos das proteínas do soro (e das caseínas) que a seguir são descritas, são também revistas de uma forma particular por vários autores:

- a) ligam-se a receptores opióides com efeito agonista ou antagonista (Meisel e FitzGerald 2000; Philanto-Leppälä 2001; Teschemacher *et al.* 1997);
- b) inibem a enzima conversora da angiotensina exercendo acção anti-hipertensora (FitzGerald e Meisel 1999, 2000; Philanto-Leppälä 2001);
- c) exercem funções imunomoduladoras (Gill *et al.* 2000; Mercier *et al.* 2004);
- d) eliminam microorganismos sensíveis;
- e) inibem a ligação do fibrinogénio a receptores específicos da superfície das plaquetas inibindo a agregação plaquetária (actividade antitrombótica) (Rutherford e Gill 2000);
- f) ligam-se a iões minerais, participam no seu transporte, aumentando a sua biodisponibilidade (Vegarud *et al.* 2000).

A libertação dos péptidos das proteínas do soro ocorre, em condições normais, durante a digestão pela acção das enzimas digestivas. O tratamento do soro ou seus derivados com enzimas proteolíticas, ou com espécies microbianas possuidoras de considerável actividade proteolítica, leva também à libertação de péptidos que depois podem ser ingeridos na sua forma activa.

## **1.4 Hidrólise enzimática das proteínas do soro**

### ***1.4.1 Obtenção de péptidos bioactivos***

Devido à especificidade enzimática (tabela 1.5), a composição da mistura de péptidos e a sua consequente bioactividade, resultante do processamento, vai depender da(s) enzima(s) ou do(s) microorganismo(s) usados no tratamento das proteínas do soro. De entre uma variedade significativa de enzimas de origem microbiológica ou digestiva, as enzimas pancreáticas, principalmente, a tripsina, têm vindo a ser usadas para a identificação e caracterização de vários péptidos bioactivos (tabela 1.6, figuras 1.5, 1.6, 1.7) (Korhonen e Philanto-Leppälä 2001).

**Tabela 1.5** Informação sobre algumas endopeptidases usadas no tratamento do soro

Enzima	Código	Ligação hidrolisada (...-P2-P1/P1'-P2'...)*
Quimosina	EC 3.4.21.1	P1 (Tyr; Trp; Phe; Leu)
Tripsina	EC 3.4.21.4	P1 (Arg; Lys)
Alcalase	EC 3.4.21.62	Maior especificidade por aa de cadeia comprida não carregada em P1
Papaína	EC 3.4.22.2	Maior especificidade por aa de cadeia comprida hidrofóbica em P2
Pepsina	EC 3.4.23.1	Maior especificidade por aa de cadeia aromática em P1 e P1'

\*([www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/)); aa, aminoácidos.

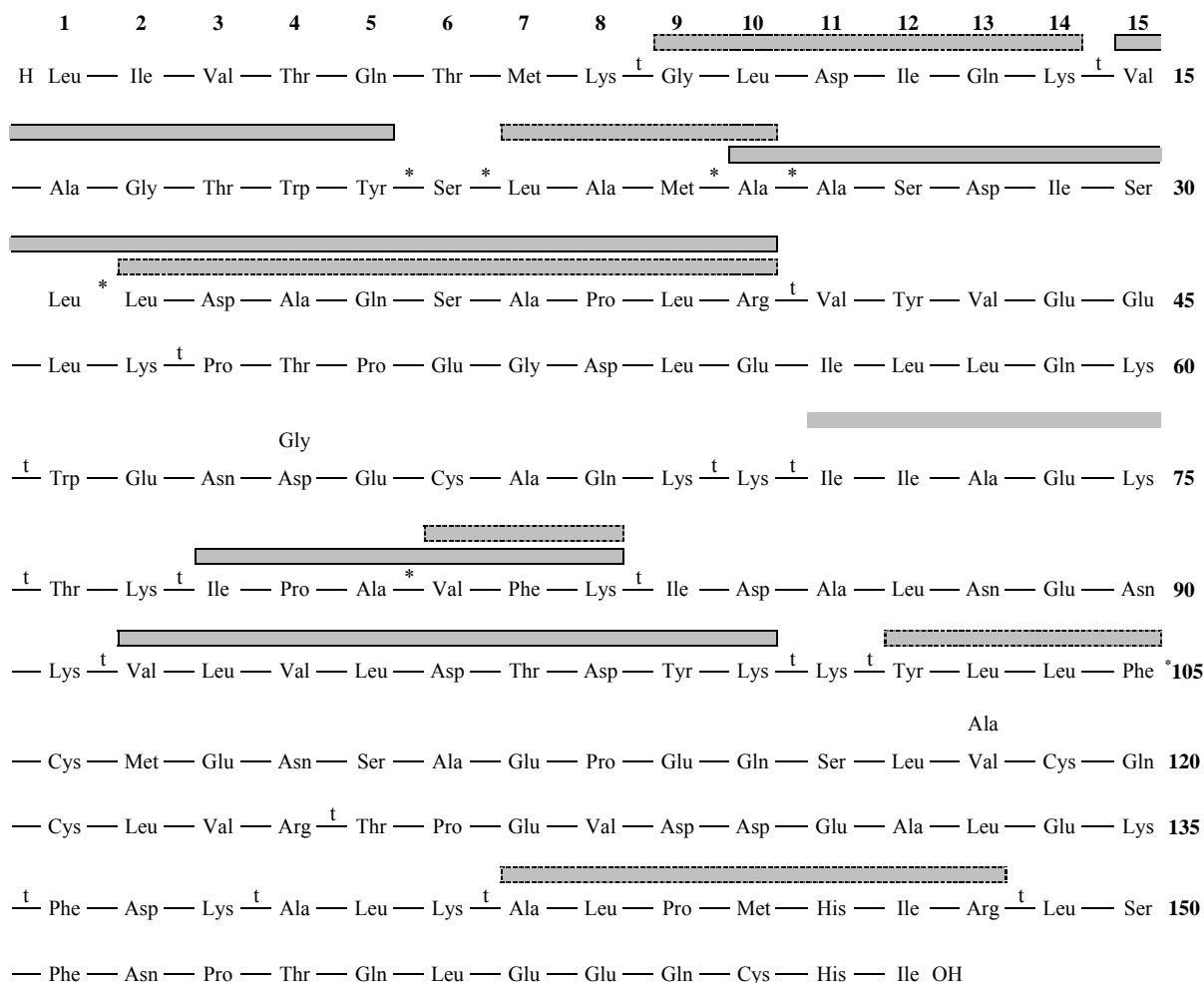
**Tabela 1.6** Péptidos biologicamente activos resultantes da hidrólise das proteínas do soro catalisada pela tripsina

		Actividade biológica						Referência
		IECA <sup>(a)</sup> IC <sub>50</sub>	O <sup>(b)</sup> IC <sub>50</sub>	IAP <sup>(c)</sup>	LIM <sup>(d)</sup>	HC <sup>(e)</sup>	BTC <sup>(f)</sup>	
Nome								
β-lactoglobulina								
1	9-14	580						(Philanto-Leppälä <i>et al.</i> 1998)
2	15-20						+	(Pellegrini <i>et al.</i> 2001a)
3	22-25	556						(Philanto-Leppälä <i>et al.</i> 2000)
4	25-40						+	(Pellegrini <i>et al.</i> 2001a)
5	32-40	635						(Philanto-Leppälä <i>et al.</i> 2000)
6	71-75					+		(Nagaoka <i>et al.</i> 2001)
7	78-83						+	(Pellegrini <i>et al.</i> 2001a)
8	81-83	1029						(Philanto-Leppälä <i>et al.</i> 2000)
9	92-100						+	(Pellegrini <i>et al.</i> 2001a)
10	102-105-NH <sub>2</sub>	β-lactorfina	172	38				(Mullally <i>et al.</i> 1996)
11	142-148		43					(Mullally <i>et al.</i> 1997)
α-lactalbumina								
12	1-5						+	(Pellegrini <i>et al.</i> 2001b)
13	17-31 S-S	109-114					+	(Pellegrini <i>et al.</i> 2001b)
14	99-108	327						(Philanto-Leppälä <i>et al.</i> 2000)
15	104-108	77						
Glicomacropéptido								
16	106-116	casoplatelina		+	+	+		
17	106-112			+				
18	112-116			+				(Jollès <i>et al.</i> 1986)
19	113-116			+				
Lactoferrina								
20	40 kDa				+	(Fe)		
21	50 kDa					+	(Fe)	(Kawakami <i>et al.</i> 1993)

IC<sub>50</sub> - Concentração do péptido (μM) que produz uma resposta igual a metade da resposta máxima.

<sup>(a)</sup> Actividade inibidora da enzima conversora da angiotensina, *in vitro* – efeito antihipertensor. Captopril, um fármaco comum usado no tratamento da hipertensão tem um IC<sub>50</sub> ~ 0,006 μM; <sup>(b)</sup> Actividade opióide *in vitro*. A morfina, o péptido opióide de referência, tem um IC<sub>50</sub> ~ 0,023 μM; <sup>(c)</sup> Actividade inibidora da agregação plaquetária, *in vitro* – efeito antitrombótico; <sup>(d)</sup> Ligação a iões minerais, *in vitro*; <sup>(e)</sup> Actividade hipocolesterolémica, *in vivo*; <sup>(f)</sup> Actividade bactericida, *in vitro*.





**Figura 1.5** Sequência em aminoácidos da  $\beta$ -lactoglobulina.

<sup>1)</sup> Ligações peptídicas potencialmente hidrolisadas pela acção da tripsina (Arai e Fujimaki 1991).

\* Ligações peptídicas hidrolisadas, segundo as referências citadas, provavelmente, devido à falta de pureza da preparação de tripsina usada (contaminação com outras enzimas).

As barras cinzentas correspondem aos péptidos descritos na tabela 6:

— Actividade inibidora da enzima conversora da angiotensina. O péptido 102-105 tem também efeito opióide;

— Actividade hipocolesterolémica;

— Actividade bactericida.

As acções fisiológicas, *in vivo*, dos péptidos ocorrem quer a nível do lúmen intestinal quer em órgãos periféricos após absorção. Para tal, depois de libertados, devem resistir intactos à acção das peptidases do epitélio intestinal e, caso sejam absorvidos, resistir também à acção das peptidases séricas até atingirem o(s) órgão(s) alvo. Enquanto que a absorção de dipéptidos e tripéptidos é mediada por um transportador intestinal independente da sequência peptídica (Döring *et al.* 1998), o mecanismo de absorção de péptidos maiores é menos eficaz e ainda não está completamente elucidado (Vermeirssen *et al.* 2002).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
H	Glu	Gln	Leu	Thr	Lys <sup>t</sup>	Cys	Glu	Val	Phe	Arg <sup>t</sup>	Glu	Leu	Lys <sup>t</sup>	Asp	Leu	15
	Lys <sup>t</sup>	Gly	Tyr	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Glu	Trp	Val	Cys	Thr	Thr	30
	Phe <sup>*</sup>	His	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Thr	Gln	Ala	Ile	Val	Gln	Asn	Asn	45
	Asp	Ser	Thr	Glu	Tyr	Gly	Leu	Phe	Gln	Ile	Asn	Asn	Lys <sup>t</sup>	Ile	Trp	60
	Cys	Lys <sup>t</sup>	Asp	Asp	Gln	Asn	Pro	His	Ser	Ser	Asn	Ile	Cys	Asn	Ile	75
	Ser	Cys	Asp	Lys <sup>t</sup>	Phe	Leu	Asp	Asp	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Ile	Met	90
	Cys	Val	Lys <sup>t</sup>	Lys <sup>t</sup>	Ile	Leu	Asp	Lys <sup>t</sup>	Val	Gly	Ile	Asn	Tyr <sup>*</sup>	Trp	Leu	105
	Ala	His	Lys <sup>t</sup>	Ala	Leu	Cys	Ser	Glu	Lys <sup>t</sup>	Leu	Asp	Gln	Trp	Leu	Cys	120
	Glu	Lys <sup>t</sup>	Leu	OH												

**Figura 1.6** Sequência em aminoácidos da  $\alpha$ -lactalbumina.

<sup>t</sup>) Ligações peptídicas potencialmente hidrolisadas pela acção da tripsina (Arai e Fujimaki 1991).

\* Ligações peptídicas hidrolisadas, segundo as referências citadas, provavelmente, devido à falta de pureza da preparação de tripsina usada (contaminação com outras enzimas).

As barras cinzentas correspondem aos péptidos descritos na tabela 6:

Actividade inibidora da enzima conversora da angiotensina;

Actividade bactericida.

..... 106 (numeração da $\kappa$ -caseína)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
	Met	Ala	Ile	Pro	Pro	Lys <sup>t</sup>	Lys <sup>t</sup>	Asn	Gln	Asp	Lys <sup>t</sup>	Thr	Glu	Ile	Pro	15
	Thr	Ile	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	Gly	Glu	Pro	Thr	Ser	Thr	Pro	Thr	30
	Thr	Glu	Ala	Val	Glu	Ser	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser	Pro	45
	Glu	Val	Ile	Glu	Ser	Pro	Pro	Glu	Ile	Asn	Thr	Val	Gln	Val	Thr	60
	Ser	Thr	Ala	Val	OH											

**Figura 1.7** Sequência em aminoácidos do glicomacropéptido.

<sup>t</sup>) Ligações peptídicas potencialmente hidrolisadas pela acção da tripsina (Arai e Fujimaki 1991).

As barras cinzentas correspondem aos péptidos descritos na tabela 6:

Actividade inibidora da agregação plaquetária.

Embora existam mais estudos *in vivo* feitos com péptidos derivados das caseínas do leite, existem já alguns estudos recentes, em animais, onde se verificam efeitos

fisiológicos dos péptidos oriundos das proteínas do soro bovino. Murakami relata uma redução significativa na tensão arterial sistólica em ratos após administração oral de um preparado de proteínas do soro (Murakami *et al.* 2004).

Muito mais é necessário estudar para compreender os mecanismos envolvidos na bioactividade dos péptidos do soro do leite, bem como avaliar a sua eficácia em termos fisiológicos nos humanos. Parece, no entanto, uma área promissora e que muito provavelmente colocará os produtos lácteos, e o soro de leite em particular, como importantes ingredientes em alimentos visando a promoção da saúde e a prevenção da doença.

#### *1.4.2 Melhor digestibilidade, menor alergenicidade*

É cada vez maior o uso de hidrolisados de proteínas em fórmulas alimentares fortificadas ou de aplicação clínica. Os hidrolisados proteicos têm particular interesse na alimentação de indivíduos com comprometimento da digestão e metabolismo proteico, e de indivíduos alérgicos às proteínas nativas, sendo as crianças particularmente susceptíveis (Clemente 2000).

A hidrólise das proteínas do soro recorrendo a enzimas permite que o processo ocorra em condições suaves, salvaguardando assim as suas propriedades nutricionais (Foegeding *et al.* 2002). Aliás, Boza e colaboradores avaliaram a recuperação de ratos sujeitos à privação de alimentos durante 72 horas e verificaram que, fornecendo um hidrolisado enzimático de proteínas do soro durante 48 horas, o ganho de peso era semelhante àquele que ocorreu em ratos alimentados com proteínas inteiras, com a vantagem de uma maior retenção de azoto no primeiro grupo (Boza *et al.* 1995a). Num estudo semelhante concluiu-se que os mesmos parâmetros melhoraram significativamente mais em ratos alimentados com hidrolisados de proteínas de soro do que em ratos alimentados com aminoácidos livres (Boza *et al.* 2000).

A alergenicidade atribuída às proteínas do leite, essencialmente à  $\beta$ -lactoglobulina, afecta cerca de 1-2% de crianças com menos de 2 anos (Bahna 1978). É algo compreensível já que se trata de uma proteína inexistente no leite humano. A alergenicidade desta proteína está associada à resistência da sua forma nativa à acção da pepsina (enzima gástrica) (Bertrand-Harb *et al.* 2002; Kitabatake e Kinekawa 1998) e à existência, na molécula, de pequenos aglomerados, sequenciais ou conformacionais, de aminoácidos hidrofílicos, apontados como determinantes antigénicos, ou epítomos

(Otani e Hosono 1987). A redução da alergenicidade do soro passa então por alterar a conformação inicial da  $\beta$ -lactoglobulina e assim aumentar a sua susceptibilidade à acção da pepsina (temperatura, pH, pressão, reacção química) e/ou por reduzir drasticamente a presença de determinantes antigénicos existentes à superfície da molécula recorrendo a enzimas proteolíticas (Boza *et al.* 1995b; Kananen *et al.* 2000; Svenning *et al.* 2000).

A hidrólise das proteínas até que o peso da maioria dos péptidos formados se situe entre 2000 e 5000 Da reduz para o mínimo a alergenicidade residual das proteínas do soro (Kananen *et al.* 2000). No entanto, a especificidade da enzima pelas zonas epitópicas da proteína parece ser o factor determinante na redução da alergenicidade da proteína (Svenning *et al.* 2000). Neste contexto, a tripsina (EC 3.4.21.4) parece ser uma das opções mais viáveis para a redução da alergenicidade das proteínas do soro (tabela 1.5 página 14).

A hidrólise das proteínas de soro leva à libertação de aminoácidos ou péptidos de sabor amargo, sendo esta uma das principais limitações à incorporação de hidrolisados proteicos em alimentos. O amargor dos péptidos está relacionado com a formação de pequenos péptidos compostos principalmente por aminoácidos hidrófobos (Clemente 2000); no entanto, para péptidos mais longos, aspectos conformacionais são também da maior importância (Bumberger e Belitz 1993). Os hidrolisados produzidos por acção de endoproteases que apresentem uma especificidade alargada, libertando péptidos com aminoácidos não polares nas extremidades, são mais amargos que aqueles produzidos por enzimas, tal como a tripsina, com maior especificidade por resíduos hidrofílicos (Adler-Nissen 1986b). Em muitos casos, surge a necessidade de aplicar processos, posteriores à hidrólise, para a remoção do amargor dos hidrolisados (Saha e Hayashi 2001).

#### *1.4.3 Análise e fraccionamento dos hidrolisados proteicos*

A determinação do grau de hidrólise de um hidrolisado proteico pode ser feita segundo a técnica de pH-stat (Adler-Nissen 1986a) que quantifica, por titulação, a variação do número de prótons livres ao longo do processo. Este método permite a monitorização da hidrólise mas é relativamente inútil na caracterização dos hidrolisados produzidos.

A caracterização do hidrolisado proteico tem, normalmente, um ou mais dos seguintes objectivos: (1) determinação da taxa de degradação de cada uma das proteínas iniciais; (2) determinação da distribuição dos pesos moleculares dos péptidos; (3) identificação

de péptidos bioactivos; (4) determinação da especificidade de novas endoproteases; (5) verificação e localização de modificações químicas na estrutura primária dos peptídeos, nomeadamente, alterações nas cadeias laterais de alguns aminoácidos e glicação dos aminoácidos por açúcares redutores (Léonil *et al.* 2000; Silvestre 1997).

Actualmente, à escala laboratorial, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas para a caracterização dos hidrolisados. Para a determinação da distribuição de pesos moleculares, paralelamente às metodologias electroforéticas, a cromatografia líquida de alta performance de exclusão molecular (SE-HPLC), baseada nas diferenças de volumes hidrodinâmicos das moléculas, tem vindo a ser largamente utilizada. A cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC), baseada essencialmente em diferenças de hidrofobicidade, tem também sido utilizada na caracterização de hidrolisados proteicos, sendo possível, através do perfil do cromatograma de RP-HPLC, prever a distribuição dos pesos moleculares dos péptidos (Van der Ven *et al.* 2001). Separações cromatográficas baseadas na carga das moléculas (cromatografia de troca iónica, IE-HPLC) ou baseadas na afinidade específica por determinados ligandos (LE-HPLC) revelam-se úteis em análises específicas de hidrolisados proteicos (Silvestre 1997).

Um detector convencional de ultra-violeta ou de fluorescência é normalmente acoplado ao sistema de cromatografia líquida. Entretanto, a possibilidade recente de utilizar um espectrómetro de massa acoplado à cromatografia líquida tem vindo a revelar-se uma ferramenta muito potente na caracterização dos hidrolisados e no estudo da relação estrutura-função das proteínas e péptidos. Esta análise torna-se valiosa na optimização das propriedades nutricionais e funcionais deste tipo de produtos (Léonil *et al.* 2000).

As técnicas cromatográficas são pouco usadas, à escala industrial, no fraccionamento dos hidrolisados proteicos devido ao seu elevado custo e baixa produtividade. Neste âmbito, as técnicas membranares de filtração e, mais recentemente, as técnicas de cromatografia membrana ultrapassam algumas das limitações da cromatografia mais convencional (Ghosh 2002; Pouliot *et al.* 1999).

## **1.5 O soro de leite – desenvolvimento de alimentos funcionais**

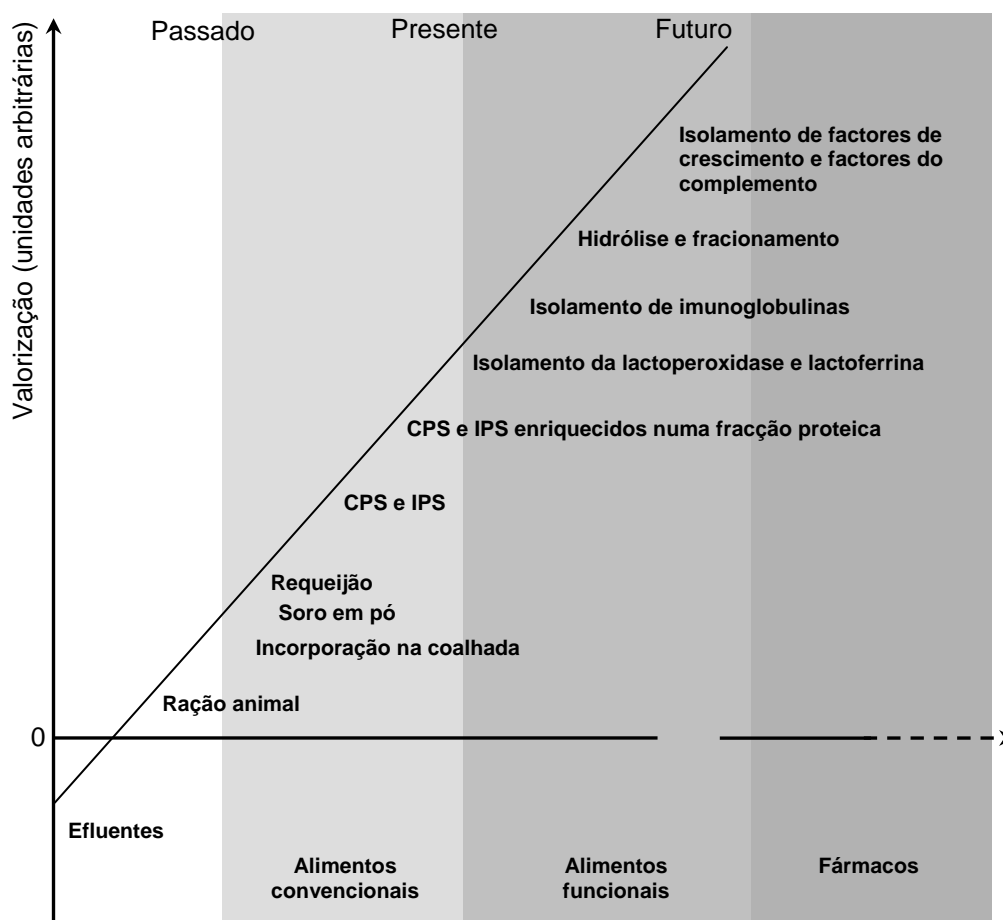
O conceito de alimento funcional há já alguns anos que faz parte do vocabulário da nutrição. Um alimento é funcional “quando for satisfatoriamente demonstrada a acção

benéfica em uma ou mais funções orgânicas, para além dos efeitos nutricionais adequados, relevantes para um estado de saúde melhorado e/ou redução do risco de doença” (Ashwell 2002).

A pesquisa feita na última década revelou a existência de vários componentes bioactivos no soro de leite já descritos e referenciados nas páginas anteriores deste trabalho. Estes componentes podem ser incorporados em vários alimentos de forma a conferir-lhes funções biológicas específicas. Os recentes avanços nas técnicas de processamento das proteínas do soro, com especial atenção para as técnicas de fraccionamento, permitem produzir múltiplos ingredientes, mais ou menos puros, para várias aplicações, entre as quais se destacam os alimentos funcionais, os alimentos para desportistas, as dietas clínicas ou os fármacos (figura 1.8) (Korhonen 2002).

Os hidrolisados de proteínas de soro, por si só ou como ingredientes de vários alimentos, têm elevado potencial de aplicação quer do ponto de vista nutricional, abordado neste capítulo, quer do ponto de vista tecnológico, que será abordado no capítulo seguinte.

Existem já, pelo menos, três leites fermentados no mercado mundial com provada actividade anti-hipertensora: Ameal da Clapis no Japão (Hata *et al.* 1996); Evolus da Valio na Finlândia e o Biozate da Davisco. Será viável a obtenção de produtos funcionais semelhantes recorrendo unicamente ao soro? Tudo indica que sim.



**Figura 1.8** Valorização do soro de leite – uma perspectiva temporal.

## 1.6 Bibliografia

- Adler-Nissen J (1986a) *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London, U.K.
- Adler-Nissen J (1986b) Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures. In: Freeney RE, Whitaker JR (eds) *Protein tailoring for food and medical uses*. Marcel Dekker, New York, pp 97-112
- Andrews AT, Alichanidis E (1983) Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Research* 50:275-290
- Arai S, Fujimaki M (1991) *Food Enzymology*. Vol 2, vol 2. Elsevier, London, New York
- Ashwell M (2002) Concepts of functional foods ILSI Europe Concise Monograph Series. International Life Sciences Institute, Brussels
- Bahna SL (1978) Control of milk allergy. A challenge for physicians, mothers and industry. *Annals of Allergy* 41:1-11
- Bertrand-Harb C, Baday A, Dalgalarondo M, Chobert J-M, Haertlé T (2002) Thermal modifications of structure and co-denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -

- lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases. *Nahrung* 46:283-289
- Bos C, Gaudichon C, Tomé D (2000) Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein quality for humans. *Journal of the American College of Nutrition* 19:191S-205S
- Bounous G (2000) Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Research* 20:4785-4792
- Bounous G, Batist G, Gold P (1989) Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. *Clinical and investigative medicine* 12:154-161
- Boza JJ, Martínez-Augustin O, Baró L, Suarez MD, Gil A (1995a) Protein v. enzymic protein hydrolysates. Nitrogen utilization in starved rats. *British Journal of Nutrition* 73:65-71
- Boza JJ, Martínez-Augustin O, Gil A (1995b) Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43:872-875
- Boza JJ, Moënnoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Ballèvre O (2000) Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *European Journal of Nutrition* 39:237-243
- Brody EP (2000) Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition* 84:S39-S46
- Bumberger E, Belitz HD (1993) Bitter taste of enzymic hydrolyzates of casein. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung* 197:14-9
- Calbet JAL, Holst JJ (2004) Gastric emptying, gastric secretion and enterogastrone response after administration of milk proteins or their peptide hydrolysates in humans. *European Journal of Nutrition* 43:127-139
- Clare DA, Swaisgood HE (2000) Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science* 83:1187-1195
- Clemente A (2000) Enzymatic protein hydrolysate in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology* 11:254-262
- de la Fuente MA, Hemar Y, Tamehana M, Munro PA, Singh H (2002) Process-induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. *International Dairy Journal* 12:361-369
- Döring F, Will J, Amasheh S, Clauss W, Ahlbrecht H, Hannelore D (1998) Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *The Journal of Biological Chemistry* 273:23211-23218
- FAO/WHO (1990) FAO/WHO: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- FitzGerald RJ, Meisel H (1999) Lactokinins: whey protein-derived ACE inhibitory peptides. *Nahrung* 43:165-167
- FitzGerald RJ, Meisel H (2000) Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition* 84:S33-S37
- Foegeding EA, Davis JP, Doucet D, McGuffey MK (2002) Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology* 13:151-159
- Francis GL, Regester GO, Webb HA, Ballard JF (1995) Extraction from cheese whey by cation-exchange chromatography of factors that stimulate the growth of mammalian cells. *Journal of Dairy Science* 78:1209-1218



- Ghosh R (2002) Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges. *Journal of Chromatography A* 952:13-27
- Gill HS, Doull F, Rutherfurd KJ, Cross ML (2000) Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition* 84:S111-S117
- Grandison AS (1996) Ion-exchange and electrodialysis. In: Grandison AS, Lewis MJ (eds) *Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries - Principles and Applications*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp 155-177
- Hata Y, Yamamoto M, Ohni M, Nakajima K, Nakamura Y, Takano T (1996) A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 64:767-771
- Hinrichs J (2001) Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal* 11:495-503
- Hoffman JR, Falvo MJ (2004) Protein - which is best? *Journal of Sports Science and Medicine* 3:118-130
- Holt C, McPhail D, Nevison I, Nylander T, Otte J, Ipsen RH, Bauer R, Ogendal L, Oleiman K, de Kruif KG, Léonil J, Mollé D, Henry G, Maubois J-L, Pérez MD, Puyol P, Calvo M, Bury SM, Kontopidis G, McNae I, Sawyer L, Ragona L, Zetta L, Molinari H, Klarenbeek B, Jonkman MJ, Moulin J, Chatterton D (1999) Apparent chemical composition of nine commercial or semi-commercial whey protein concentrates, isolates and fractions. *International Journal of Food Science & Technology* 34:543-556
- Huffman LM, Harper WJ (1999) Maximizing the value of milk through separation technologies. *Journal of Dairy Science* 82:2238-2244
- Jollès P, Lévy-Toledano S, Fiat AM, Soria C, Gillesen D, Thomaidis A, Dunn FW, Caen JB (1986) Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from k-casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry* 158:379-382
- Kananen A, Savolainen J, Mäkinen J, Perttilä U, Myllykoski L, Philanto-Leppälä A (2000) Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. *International Dairy Journal* 10:691-697
- Kanyshkova TG, Buneva VN, Nevinsky GA (2001) Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry (Moscow)* 66:1-7
- Kawakami H, Dosako S, Nakajima I (1993) Effect of lactoferrin on iron solubility under neutral conditions. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57:1376-1377
- Kitabatake N, Kinekawa Y-I (1998) Digestibility of bovine milk whey protein and  $\beta$ -lactoglobulin in vitro and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:4917-4923
- Koistinen H, Koistinen R, Seppälä M, Burova TV, Choiset Y, Haertlé T (1999) Glycodelin and  $\beta$ -lactoglobulin, lipocalins with a high structural similarity, differ in ligand binding properties. *FEBS Letters* 450:158-162
- Korhonen H (2002) Technology option for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology* 55:79-88
- Korhonen H, Marnila P, Gill HS (2000) Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition* 84:S75-S80
- Korhonen H, Philanto-Leppälä A (2001) Milk protein-derived bioactive peptides - novel opportunities for health promotion. *Bulletin of the IDF* 363:17-26
- Korhonen H, Philanto-Leppälä A, Rantamäki P, Tupasela T (1998) The functional and biological properties of whey proteins: prospects for the development of functional foods. *Agricultural and Food Science in Finland* 7:283-296

- Kussendrager KD, Van Hooijdonk ACM (2000) Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition* 84:S19-S25
- Ledoux N, Mahé S, Dubarry M, Bourras M, Benamouzig R, Tomé D (1999) Intraluminal immunoreactive caseinomacropeptide after milk protein ingestion in humans. *Nahrung* 43:196-200
- Léonil J, Gagnaire V, Mollé D, Pezenec S, Bouhallab S (2000) Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides. *Journal of Chromatography A* 881:1-21
- Lewis MJ (1996) Pressure-activated membrane processes. In: Grandison AS, Lewis MJ (eds) *Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries - Principles and Applications*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp 65-96
- Malcata FX (1999) Critical issues affecting the future of dairy industry: individual contributions in the scope of a global approach. *Journal of Dairy Science* 82:1595-1611
- Markus CR, Olivier BO, de Haan EHF (2002) Whey protein rich in  $\alpha$ -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 75:1051-1056
- Markus CR, Olivier BO, Panhuysen GEM, Van der Gugten J, Alles MS, Tuiten A, Westenberg HGM, Fekkes D, Koppeschaar HF, de Haan EHF (2000) The bovine protein  $\alpha$ -lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. *American Journal of Clinical Nutrition* 71:1536-1544
- McIntosh GH, Royle PJ, Le Leu RK, Regester GO, Johnson MA, Grinsted RL, Kenward RS, Smithers GW (1998) Whey protein as a functional food ingredients? *International Dairy Journal* 8:425-434
- McManaman JL, Neville MC (2003) Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:629-641
- Meisel H (1997) Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 43:119-128
- Meisel H, FitzGerald RJ (2000) Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition* 2000:S27-S31
- Meisel H, Frister H, Schlimme E (1989) Biologically active peptides in milk proteins. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 28:267-278
- Mercier A, Gauthier SF, Fliss I (2004) Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *International Dairy Journal* 14:175-183
- Morr MV, Foegeding EA (1990) Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. *Food Technology*:100-112
- Mullally MM, Meisel H, FitzGerald RJ (1996) Synthetic peptides corresponding to  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 377:259-260
- Mullally MM, Meisel H, FitzGerald RJ (1997) Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *FEBS Letters* 402:99-101
- Mulvihill DM, Donovan M (1987) Whey proteins and their thermal denaturation - a review. *Irish Journal of Food Science and Technology* 11:43-75

- Murakami M, Tonouchi H, Takahashi R, Kitazawa H, Kawai Y, Negishi H, Saito T (2004) Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide ( $\beta$ -Lactosin B) isolated from a commercial whey product. *Journal of Dairy Science* 87:1967-1974
- Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Tadashi K, Kuwata T (2001) Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281:11-17
- Otani H, Hosono A (1987) The immunochemical properties of bovine  $\beta$ -casein digested with trypsin and/or V8 protease from *Staphylococcus aureus*. *Japanese Society of Zootechnical Science* 58:618-627
- Pellegrini A, Dettling C, Thomas U, Hunziker P (2001a) Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1526:131-140
- Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, Hunziker P, von Fellenberg R (2001b) Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\alpha$ -lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426:439-448
- Permyakov EA, Berliner LJ (2000)  $\alpha$ -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters* 473:269-274
- Pessen H, Purcell JM, Farrell HM (1985) Proton relaxation rates of water in dilute solutions of  $\beta$ -lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by the use of two genetic variants of a self-associating globular protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 828:1-12
- Philanto-Leppälä A (2001) Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology* 11:347-356
- Philanto-Leppälä A, Koskinen P, Piilola K, Tupasela T, Korhonen H (2000) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research* 67:53-64
- Philanto-Leppälä A, Rokka T, Korhonen H (1998) Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from brovine milk proteins. *International Dairy Journal* 8:325-331
- Pouliot Y, Wijers MC, Gauthier SF, Nadeau L (1999) Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. *Journal of Membrane Science* 158:105-114
- Regester GO, Belford DA (1999) New therapeutics from a dairy byproduct - cheese whey. *Drug Development Research* 46:286-291
- Rutherford KJ, Gill HS (2000) Peptides affecting coagulation. *British Journal of Nutrition* 80:S99-S102
- Saha BC, Hayashi K (2001) Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnology Advances* 19:355-370
- Schanbacher FL, Talhouk RS, Murray FA (1997) Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Production Science* 50:105-123
- Shah NP (2000) Effects of milk-derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition* 84:S3-S10
- Silvestre MPC (1997) Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry* 60:263-271
- Simpson KJ, Nicholas KR (2002) The comparative biology of whey proteins. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7:313-326

- Smithers GW, Ballard JF, Copeland AD, de Silva KJ, Dionysius DA, Francis GL, Goddard C, Grieve PA, McIntosh GH, Mitchell IR, Pearce RJ, Regester GO (1996) New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *Journal of Dairy Science* 79:1454-1459
- Steijns JM, Van Hooijdonk ACM (2000) Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition* 84:S11-S17
- Svenning C, Brynhildsvold J, Molland T, Langsrud T, Vegarud GE (2000) Antigenic response of whey proteins and genetic variants of  $\beta$ -lactoglobulin - the effect of proteolysis and processing. *International Dairy Journal* 10:699-711
- TECNINVEST (2000) Estudo de mercado do soro lácteo em Portugal (T90101/2000). Associação Nacional dos Industriais de Lacticínios
- Teschemacher H, Koch G, Brantl V (1997) Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers* 43:99-117
- Van der Ven C, Gruppen H, de Bont DBA, Voragen AGJ (2001) Reversed phase and size exclusion chromatography of milk protein hydrolysates: relation between elution from reversed phase column and apparent molecular weight distribution. *International Dairy Journal* 11:83-92
- Vegarud GE, Langsrud T, Svenning C (2000) Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *British Journal of Nutrition* 84:S91-S98
- Vermeirssen V, Deplancke B, Tappenden KA, Van Camp J, Gaskins HR, Verstraete W (2002) Intestinal transport of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg through a Caco-2 Bbe monolayer. *Journal of Peptide Science* 8:95-100
- Walzem RL, Dillard CJ, German JB (2002) Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42:353-375
- [www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/)

# **CAPÍTULO 2**

## **Proteínas do soro de leite bovino - Gelificação e géis**

**Concentração proteica, hidrólise enzimática**

**Mistura proteína/polissacarídeos**

### **2.1 Propriedades funcionais das proteínas do soro**

As propriedades funcionais são o elo entre as propriedades físico-químicas e as características sensoriais dos alimentos (Lorient 1988). As proteínas do soro possuem propriedades físico-químicas que lhes conferem propriedades funcionais interessantes para aplicações alimentares (Korhonen *et al.* 1998). Na funcionalidade das proteínas do soro inclui-se:

- a) boa solubilidade em água;
- b) capacidade de transportar pequenas moléculas lipofílicas (caso da  $\beta$ -lactoglobulina) e iões (caso da lactoferrina);
- c) acção tensioactiva - permite a obtenção e estabilização de sistemas bifásicos (emulsões e espumas);

d) propriedades gelificantes - possibilitam a retenção de grandes quantidades de água e outras pequenas moléculas dentro da matriz bem como conferir estrutura e estabilidade aos alimentos.

### **2.1.1 Gelificação das proteínas do soro**

A gelificação das proteínas do soro pode ser induzida por vários factores físicos e químicos desde que, depois de uma alteração da estrutura nativa da proteína (desnaturação), se estabeleçam interacções proteína-proteína (agregação) que originem uma rede tridimensional. O aparecimento da rede tridimensional (fracção gel) é um acontecimento momentâneo que ocorre quando o número de interacções atinge um valor crítico (Clark 1992). Se a concentração proteica não for suficientemente alta a rede tridimensional não se forma e à agregação segue-se a precipitação dos agregados proteicos (Gosal e Ross-Murphy 2000; Renkema 2001a). A concentração crítica de gelificação ( $C_0$ ) de uma proteína depende das condições do meio em que está inserida (condições de pH, força iónica, tipo de sal, etc.). Para a  $\beta$ -lactoglobulina, em condições de baixa força iónica,  $C_0$  é de 12,2% para pH próximo de 7, enquanto que se aproxima dos 7% quando  $2 < \text{pH} < 3$  (Kavanagh *et al.* 2000a); no entanto, estes valores baixam quando a força iónica do meio é ligeiramente aumentada.

No momento da gelificação, apenas alguns agregados proteicos estão incorporados na incipiente rede inicial. À medida que a gelificação prossegue, a fracção não agregada diminui, aumentando o carácter sólido do gel, num processo também designado por “cura” (Clark 1992). A quantidade de proteína agregada no momento da gelificação é determinante na estrutura espacial do gel final, à escala micrométrica, e na permeabilidade do gel (propriedade relacionada com a capacidade de retenção de água). Por seu lado, a incorporação de proteína na rede tridimensional durante a cura do gel determina, essencialmente, a elasticidade do gel e a sua microestrutura a uma escala menor (Verheul e Roefs 1998a, b; Verheul *et al.* 1998).

As condições externas (temperatura, pH e força iónica) balanceiam as forças atractivas e repulsivas proteína-proteína e proteína-solvente que, consequentemente, afectam as taxas de desnaturação e de agregação, determinando assim a estrutura final do gel (Errington e Foegeding 1998; Hudson *et al.* 2000).

Quando a desnaturação das proteínas ocorre em condições de forte repulsão electrostática (força iónica baixa,  $<0,1$  M e longe do ponto isoeléctrico) a agregação é pouco favorecida relativamente à desnaturação. Nestas condições a rede tridimensional que forma o gel é fina e o gel é translúcido. Em condições onde a agregação é favorecida (força iónica alta e pH perto do ponto isoeléctrico) o gel formado é opaco revelando uma rede tridimensional grosseira (Clark *et al.* 1981; Stading *et al.* 1993).

O aquecimento é o processo clássico de indução da desnaturação. A desnaturação das diferentes proteínas do soro de leite ocorre a temperaturas diferentes; além disso, a temperatura de desnaturação de cada uma depende de condições extrínsecas. A temperatura de desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina diminui de  $82^{\circ}\text{C}$  para  $64,6^{\circ}\text{C}$  quando o pH aumenta de 3,5 para 8,0 (Bernal e Jelen 1985; Liu *et al.* 1994), enquanto que, a temperatura de desnaturação da  $\alpha$ -lactalbumina aumenta ligeiramente de  $59^{\circ}\text{C}$  para  $62^{\circ}\text{C}$  quando o pH aumenta de 3,5 para 7,5 (de Wit e Klarenbeek 1984). Dada a sua grande quantidade relativa, as propriedades de desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina vão determinar as propriedades de gelificação dos preparados de proteínas do soro de leite bovino.

As interacções proteína-proteína podem ser fracas e reversíveis ou covalentes. As ligações intermoleculares fracas são, essencialmente, de três tipos: a) interacções hidrofóbicas ( $5\text{-}10$  kJ/mol) resultam da exposição de grupos hidrofóbicos durante a desnaturação, b) pontes de hidrogénio ( $10\text{-}40$  kJ/mol) resultam da interacção entre cadeias laterais hidrofílicas de aminoácidos; e c) interacções electrostáticas ( $25\text{-}80$  kJ/mol) que resultam de interacções entre grupos carregados. As ligações covalentes ( $200\text{-}400$  kJ/mol) estabelecem-se, maioritariamente, entre grupos sulfidrilo (ligações dissulfureto) (Nielsen 1995).

A pH neutro, a estrutura dos géis térmicos de proteínas de soro de leite bovino parece ser suportada, em grande parte, por interacções hidrofóbicas (essencialmente) e por interacções covalentes (Havea *et al.* 2004; Shimada e Cheftel 1988). A pH ácido, os géis formados, de natureza pouco elástica, parecem ser suportados essencialmente por pontes de hidrogénio (Shimada e Cheftel 1988).

## 2.2 Estudo da gelificação e dos géis

O estudo da gelificação (das proteínas do soro de leite, em particular) tem recorrido a técnicas que permitem ilustrar as alterações e interacções moleculares inerentes ao processo de gelificação (Clark 1992). De entre estas, destacam-se as técnicas espectroscópicas (Corredig *et al.* 2004; Ikeda 2003; Kavanagh *et al.* 2000b; Lefèbvre e Subirade 2000; Renard *et al.* 2002), as técnicas de difracção da luz visível, de raios-X e de neutrões (Harada e Matsuoka 2004; Kavanagh *et al.* 2000b) e a calorimetria diferencial (Hudson *et al.* 2000; Nishinari 1997).

As várias técnicas microscópicas, também largamente utilizadas (Boye *et al.* 2000; Marangoni *et al.* 2000; Morris *et al.* 2001; Renard *et al.* 2002; Verheul e Roefs 1998b), possibilitam a visualização da microestrutura do gel (caracterizar o tipo de rede formada, a agregação e tamanho dos agregados). As técnicas microscópicas têm particular interesse quando se estuda a gelificação de misturas de proteínas de soro e outro biopolímero (ex. polissacarídeos), tema que será abordado mais adiante neste capítulo.

Como a gelificação é, essencialmente, uma transição do estado líquido para o estado sólido, a monitorização das alterações das propriedades mecânicas do material, durante a gelificação e cura do gel, é do maior interesse (Clark 1992). Neste contexto, os estudos reológicos assumem um papel primordial (Ikeda 2003; Kavanagh *et al.* 2000b; Marangoni *et al.* 2000).

As propriedades de textura, muitas vezes estudadas recorrendo a ensaios empíricos que simulam o processo de mastigação, permitem caracterizar os géis maduros e são aplicados em vários estudos (Errington e Foegeding 1998; Marangoni *et al.* 2000; Yong e Kilara 1998). Ensaio de permeabilidade são também aplicados a géis de proteínas do soro (Verheul e Roefs 1998a, b). A permeabilidade relaciona-se com a capacidade de retenção de água dos géis que é também avaliada em vários estudos onde se caracterizam géis curados (Chantrapornchai e McClements 2002; Hudson *et al.* 2000).

Nos estudos efectuados ao longo deste trabalho foram utilizadas técnicas reológicas na monitorização do processo de gelificação e caracterização dos géis. A microscopia óptica e microscopia confocal de varrimento laser foram utilizadas na observação da sua microestrutura. Foi, também, avaliada a capacidade de retenção de água dos géis produzidos.



## 2.2.1 Reologia

### 2.2.1.1 Ensaios oscilatórios

Durante o processo de gelificação, as amostras são testadas, necessariamente, de forma não destrutiva. A amostra é, normalmente, colocada entre um prato inferior fixo e um sistema de medida superior (cone ou prato) móvel, cujo eixo é perpendicular ao plano do prato. Aplica-se uma deformação de corte (em reómetros de deformação controlada), ou tensão de corte (em reómetros de tensão controlada), função sinusoidal do tempo (com uma determinada frequência,  $\omega$ ), que gera uma tensão (ou deformação), também sinusoidal do tempo, como resposta.

Se, por exemplo, for aplicada uma deformação ( $\gamma$ ) sinusoidal, de acordo com a expressão,

$$\gamma = \gamma_0 \cos(\omega t) \quad [\text{II.1}]$$

no domínio de amplitudes em que o comportamento do material é viscoelástico linear, a tensão de corte resultante será também uma função sinusoidal do tempo, com a mesma frequência, mas, em alguma medida, desfasada da deformação a que foi sujeita (ângulo de fase,  $\delta$ ),

$$\sigma = \sigma_0 \cos(\omega t + \delta) \quad [\text{II.2}]$$

onde  $\gamma_0$  e  $\sigma_0$  são, respectivamente, as amplitudes máximas de deformação e tensão,  $\omega$  a frequência e  $t$  o tempo.

A tensão, bem como o seu desfasamento relativamente à amplitude de deformação imposta, são registados; esta resposta é decomposta numa componente elástica (em fase com a tensão) e numa componente viscosa (desfasada 90° da tensão sinusoidal imposta) (figura 2.1).

Pela representação vectorial é possível apresentar a deformação e a tensão de corte sob a forma de números complexos (Ferry 1980),

$$\gamma^* = \gamma_0 (\cos[\omega t] + i \text{sen}[\omega t]) \quad [\text{II.3}]$$

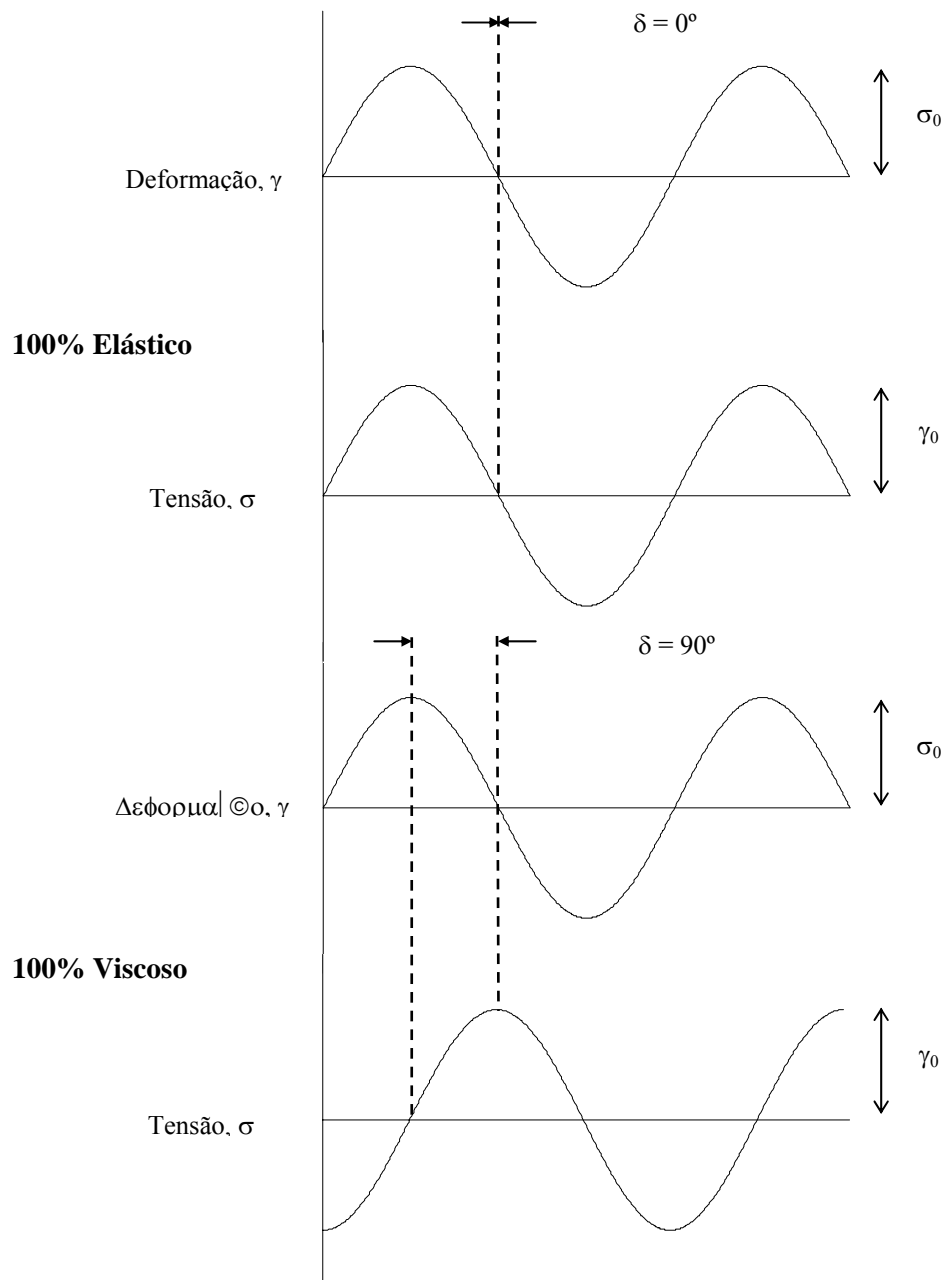
$$\sigma^* = \sigma_0 (\cos[\omega t + \delta] + i \text{sen}[\omega t + \delta]) \quad [\text{II.4}]$$

donde se deduz o módulo complexo ( $G^*$ ), que pode ser expresso em termos de amplitude e ângulo de diferença de fase, ou então, como é mais usual, em termos da sua parte real ( $G'$ ) e imaginária ( $G''$ ) (equações II.5, II.6 e II.7).

$$G^* = \frac{\sigma^*}{\gamma^*} = G' + iG'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} (\cos \delta + i \text{sen} \delta) \quad [\text{II.5}]$$

$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta \quad [\text{II.6}]$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \sin \delta \quad [\text{II.7}]$$



**Figura 2.1** Função sinusoidal da deformação imposta e da tensão resposta para um material puramente elástico ( $\delta = 0^\circ$ ) e puramente viscoso ( $\delta = 90^\circ$ ). Para materiais viscoelásticos  $\delta \in ]0, 90[$ . Adaptado de (Alves 2001)

O módulo de armazenamento ( $G'$ ) e o módulo de perda ( $G''$ ) definidos são grandezas físicas objectivas sendo utilizadas para interpretações acerca do processo de gelificação e cura do gel em estudo (Clark 1992).

#### 2.2.1.2 Reologia dos géis de proteínas do soro de leite

Durante o aquecimento de uma suspensão de proteínas de soro de leite (em determinadas condições de pH, força iónica, tipo de sal, etc.), com concentração  $C$  (superior à concentração crítica de gelificação,  $C_0$ ), a uma temperatura  $T$  (superior à temperatura de desnaturação,  $T_d$ ), o módulo de armazenamento ou elástico ( $G'$ ) começa a aumentar até ao momento em que cruza o módulo de perda ou viscoso ( $G''$ ). Esse instante, embora dependente da frequência de oscilação (Winter e Mours 1997) é, normalmente, considerado o tempo de gelificação ( $t_g$ ) para soluções de proteínas (Ikeda *et al.* 2001). A partir desse momento,  $G'$  e  $G''$  aumentam. No entanto, a taxa de crescimento de  $G'$  ( $dG'/dt$ ) é muito superior à taxa de crescimento de  $G''$  ( $dG''/dt$ ), o que reflecte o aumento da elasticidade do gel. A medida que  $t \rightarrow \infty$ , os módulos tendem para um valor limite, com  $G' \gg G''$  (Clark 1992; Gosal e Ross-Murphy 2000). É importante referir que, no caso de suspensões líquidas de proteínas globulares, nem sempre  $G''$  é superior a  $G'$ , como seria de esperar para um fluido, revelando este comportamento a existência de alguma estrutura resultante de alguma pré-agregação das partículas proteicas (Kavanagh *et al.* 2000a).

O arrefecimento do gel de proteínas de soro leva a um aumento dos módulos  $G'$  e  $G''$ , atribuído ao incremento de interacções não covalentes intra- e inter-moleculares resultantes da diminuição da motilidade das proteínas (Renkema 2001b). Recorrendo a estudos espectroscópicos, concluiu-se que o fortalecimento das pontes de hidrogénio contribui, em grande parte, para o endurecimento do gel durante o arrefecimento (Lefèbvre e Subirade 2000).

##### 2.2.1.2.1 Variação do modulo elástico em função da concentração – modelos escalares

Quando a concentração de proteínas aumenta, o valor de  $G'$  de equilíbrio aumenta de forma  $G' \propto C^n$  com  $n = 2 \pm 0,25$  quando  $C > \sim 5C_0$ . Para valores de concentrações mais próximos de  $C_0$ , são obtidos valores de  $n$  maiores de forma que quando  $C \rightarrow C_0$ , o expoente  $n \rightarrow \infty$ . Esta observação é uma das críticas feitas por alguns autores (Gosal e Ross-Murphy 2000; Kavanagh *et al.* 2000a) à aplicação de modelos fractais na análise

da relação  $G' \propto C^n$  em géis de proteínas globulares (Eleya *et al.* 2004; Hagiwara *et al.* 1998; Ikeda *et al.* 1999).

Nos modelos fractais, assume-se que a estrutura desordenada dos agregados que compõem um gel pode, em certas escalas de tamanho, ser descrita em termos de geometrias fractais (Bremer *et al.* 1989; Shih *et al.* 1990; Wu e Morbidelli 2001) e disso não parece haver dúvida. No entanto, a análise da relação  $G' \propto C^n$ , em termos de fractalidade, assume que  $C_0 = 0$  e que, no momento da gelificação, todo o polímero é incorporado na rede do gel, pressupostos que não se verificam em géis de proteínas do soro. Shih *et al.* (1990) refere que a aplicação dos modelos fractais deve ser feita apenas para concentrações “bem acima” do limiar de gelificação, pois só a partir daí, o valor de  $n$  da relação  $G' \propto C^n$  (e  $m$  da relação  $\gamma_c \propto C^m$ , sendo  $\gamma_c$  a deformação crítica do gel, ver figura 3.6 página 54) é ditado pela natureza fractal dos agregados coloidais. Se considerarmos que, nos géis de proteínas do soro,  $n$  se torna constante quando  $C > \sim 10C_0$  (Gosal e Ross-Murphy 2000), e  $C_0$  é, em situações favoráveis de pH e força iónica,  $\sim 1\%$  (pode ir até  $\sim 12\%$  no caso da  $\beta$ -lactoglobulina a pH neutro e baixa força iónica), então o modelo fractal só se aplicará em concentrações superiores a  $\sim 10\%$  (ou  $\sim 120\%$  para a  $\beta$ -lactoglobulina!). Acrescente-se que, em termos práticos, é difícil conseguir soluções de proteínas de soro com concentrações de proteína superiores a 25%, o que deixa uma gama de concentração muito pequena ( $\sim 0,4$  décadas) para estabelecer o valor de  $n$ , usado para extrair a dimensão fractal.

Kavanagh *et al.* (2000a) mostraram que o modelo da cascata (um modelo desenvolvido a partir da teoria da ramificação) descreve com sucesso a relação entre o  $G'$  e  $C$ , em géis de  $\beta$ -lactoglobulina a vários pHs, numa gama alargada de concentrações, permitindo a determinação de  $C_0$ .

### 2.2.2 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água é uma das principais e desejáveis propriedades funcionais de um gel. A água é retida na estrutura do gel por forças de capilaridade ou, simplesmente, é aprisionada na malha gelificada. Na maior parte dos estudos efectuados, a capacidade de retenção de água foi avaliada recorrendo a técnicas de centrifugação e quantificando a água expelida do gel por diferença de peso. Neste tipo de ensaios, convém salientar, as amostras são sujeitas a forças centrífugas relativamente elevadas e a quantidade de água que sai da amostra vai depender, não só da capacidade

intrínseca do gel reter a água, mas também da compressibilidade do próprio gel (maior compressibilidade implicará menor quantidade de água retida) (Otte *et al.* 2000). Durante o processo de gelificação, o arranjo da estrutura tridimensional pode levar à exclusão de parte da água inicial (nas técnicas de centrifugação, este aspecto não é considerado). Este processo de exsudação, a que chamamos sinérese, pode continuar ao longo do tempo de existência do gel. Neste trabalho, ensaiou-se, uma técnica simples que permite quantificar a água perdida pelo gel durante e após a gelificação.

### 2.3 Hidrólise enzimática vs gelificação

A hidrólise enzimática das proteínas do soro leva a alterações moleculares, mais ou menos profundas, algumas já referidas no capítulo anterior, que dependem essencialmente da enzima utilizada, do grau e das condições de hidrólise (temperatura e pH) que podem alterar a especificidade da enzima (Adler-Nissen 1986; Van der Ven 2002). A modificação das características moleculares das proteínas do soro (carga, peso molecular, exposição de grupos hidrofóbicos e exposição de grupos reactivos) pode ser utilizada para alterar as condições de gelificação (Foegeding *et al.* 2002).

À semelhança do que acontece no fabrico de queijo quando, por acção de uma protease (renina), ocorre a coagulação das caseínas do leite, as proteínas do soro do leite podem, em determinadas condições, gelificar, também por acção de proteases. O tratamento de uma solução de proteínas de soro (12%) com uma protease extraída do *Bacillus licheniformis* leva, inicialmente, à agregação das proteínas e, posteriormente, à sua gelificação, quando o grau de hidrólise supera os 2,0% (Otte *et al.* 1996). Um fenómeno semelhante ocorre durante a hidrólise de uma solução de proteínas de soro (20%) com a Alcalase 2.4L®, quando o grau de hidrólise é superior a 18% (Doucet *et al.* 2001).

A formação de agregados proteicos, recorrendo a tratamento enzimático (protease extraída do *Bacillus licheniformis*), pode também ser usada para alterar as propriedades de gelificação das proteínas do soro por acção posterior de vários factores fisico-químicos (calor, adição de sais e acidificação do meio) (Ju e Kilara 1998). A gelificação por acção enzimática pode ser melhorada, pela prévia desnaturação das proteínas do soro, aquecendo a solução acima da temperatura de desnaturação e concentração abaixo de  $C_0$ . Esta acção leva a um aumento da taxa de gelificação e à formação de géis com estrutura menos grosseira após incubação das proteínas do soro com a protease do

*Bacillus licheniformis* (Ju *et al.* 1997). Nesse trabalho, é ainda referido que, enquanto a hidrólise ligeira das proteínas do soro (grau de hidrólise inferior a 0,2%) conduz a um aumento da dureza dos géis preparados por aquecimento, hidrólise mais extensa reduz essa mesma dureza. Num trabalho posterior, desta vez com a  $\beta$ -lactoglobulina isolada, este comportamento foi novamente observado e sugeridos alguns mecanismos explicativos para o aumento da dureza do gel obtido por aquecimento da solução proteica minimamente hidrolisada: a) a acção da protease expõe e liberta sequências hidrofóbicas que podem interagir formando agregados péptido-péptido e péptido-proteína; b) numa fase inicial da hidrólise é preferencialmente libertado o péptido N-terminal hidrofílico da  $\beta$ -lactoglobulina (1-45), carregado negativamente, que pode interagir com locais carregados positivamente noutras moléculas e assim diminuir as repulsões electrostáticas, favorecendo a agregação (Otte *et al.* 2000). Por outro lado, a diminuição da quantidade de proteína que pode ser integrada na rede tridimensional que forma o gel pode explicar a diminuição da força do gel à medida que a hidrólise se vai estendendo (Ju *et al.* 1997; Otte *et al.* 2000).

Num outro estudo, onde se usou a tripsina imobilizada para hidrolisar as proteínas de um isolado proteico de soro, observou-se uma diminuição da capacidade de gelificação (Huang *et al.* 1999). Os autores atribuem esta alteração, sobretudo, ao facto de durante a hidrólise com tripsina se libertar um péptido hidrofóbico da  $\beta$ -lactoglobulina ( $\sim 8,4$  kDa) que parece aumentar a estabilidade térmica da  $\beta$ -lactoglobulina, provavelmente, ligando-se à sua superfície.

O efeito da hidrólise das proteínas do soro de leite anterior à gelificação por aquecimento não é linear, mas sim dependente de vários factores, nomeadamente, das condições de pH, força iónica e concentração de proteína na solução em causa (Otte *et al.* 2000).

## **2.4 Misturas proteína-polissacarídeo**

Os sistemas mistos de proteínas e de polissacarídeos encontram-se em muitas formulações alimentares pois conferem propriedades específicas de textura e microestruturas alternativas (Olsson *et al.* 2002). Apesar disso, o conhecimento sobre as interacções que regulam a funcionalidade destes sistemas é ainda bastante escasso (Doublier *et al.* 2000).

Na maior parte dos sistemas proteína-polissacarídeo ocorre separação de fases (Doublier *et al.* 2000; Grinberg e Tolstoguzov 1997). A separação de fases pode ser do tipo associativa se as interações entre os dois biopolímeros são favorecidas relativamente às interações polímeros-solvente, o que leva à formação de duas fases, uma rica em solvente e outra onde se concentram os dois polímeros associados (coacervados). Quando as interações polímero-solvente estiverem favorecidas relativamente às interações entre os dois polímeros (incompatibilidade termodinâmica), a separação de fases diz-se segregativa e, neste caso, cada uma das fases formadas é mais concentrada num dos biopolímeros (Doublier *et al.* 2000; Schmitt *et al.* 1998).

Na separação de fases associativa, formam-se complexos entre polissacarídeos aniónicos (goma arábica, pectina, etc.) e proteínas carregadas positivamente. As condições de força iónica e de pH são determinante para este tipo de interacção pois permitem manter o polissacarídeo carregado negativamente e, simultaneamente, manter a proteína com carga global positiva ou muito perto da neutralidade (Schmitt *et al.* 2001; Serov *et al.* 1985). As forças de associação são essencialmente de natureza electrostática; no entanto, a associação também pode ser induzida inicialmente por interações hidrofóbicas, pontes de hidrogénio ou forças de interacção fraca. As proteínas de conformação flexível, como a gelatina e as caseínas, interagem mais fortemente com os polissacarídeos do que as proteínas globulares, que vêm a sua afinidade de ligação aumentar depois de desnaturadas, quando a sua compactação diminui (Doublier *et al.* 2000; Schmitt *et al.* 1998).

A incompatibilidade termodinâmica e segregação de duas fases numa mistura de polissacarídeos e proteínas surge quando o polissacarídeo é neutro, ou quando as condições de pH e força iónica possibilitam que um polissacarídeo aniónico e uma proteína possuam a mesma carga global. Em condições de pH perto do ponto isoeléctrico, aumentam as interações entre as proteínas e a agregação é acelerada pela presença de polissacarídeo. Syrbe *et al.* (1995) estudaram o comportamento de misturas de proteínas de soro e alguns polissacarídeos neutros (arabinogalactano, dextrano, maltodextrinas e metilcelulose) e verificaram separação de fases segregativa em condições de pH perto do ponto isoeléctrico e baixa força iónica, dependente da dimensão molecular do polissacarídeo (maior tamanho molecular implica maior incompatibilidade). Com polissacarídeos aniónicos ( $\kappa$ -carragenina e carboximetilcelulose de sódio) e goma de guar verificaram o mesmo fenómeno apenas com as proteínas desnaturadas (Syrbe *et al.* 1995).

A separação de fases segregativa pode ser interrompida quando ocorre a gelificação de um ou dos dois componentes da mistura. Neste caso, as cinéticas de separação e de gelificação, vão determinar a heterogeneidade da microestrutura e as propriedades do gel formado (Doublier *et al.* 2000). Está descrito um reforço das propriedades dos géis de proteínas de soro quando são misturadas com polissacarídeos gelificantes. Um aumento da elasticidade do gel foi observado em misturas de proteínas de soro e  $\kappa$ -carragenina (Eleya e Turgeon 2000; Turgeon e Beaulieu 2001) e agar (Clark *et al.* 1982), relativamente ao gel obtido apenas com proteínas. Quando as proteínas de soro são misturadas com polissacarídeos não gelificantes como o xantano (Zasytkin *et al.* 1996), amilopectina (Olsson *et al.* 2002) ou os galactomananos (Gonçalves *et al.* 2004b) ocorre, normalmente, um decréscimo da elasticidade do gel. No entanto, a baixas concentrações de polissacarídeos, a separação de fases segregativa leva a um aumento da concentração de proteína na fase contínua do gel, o que pode levar a um aumento significativo da elasticidade do gel, se a conectividade entre os agregados proteicos (fase gelificante) não se deteriorar (Bryant e McClements 2000; Gonçalves *et al.* 2004b; Syrbe *et al.* 1995).

#### **2.4.1 Galactomananos**

Os galactomananos são polissacarídeos neutros encontrados no endosperma das sementes de muitas leguminosas. Estruturalmente, são compostos por cadeias lineares de resíduos (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-manopiranosil com vários graus de substituição por uma unidade de  $\alpha$ -D-galactopiranosil ligada através duma ligação do tipo (1 $\rightarrow$ 6). Comercialmente, estão disponíveis galactomananos (conhecidos por gomas) extraídos das sementes de quatro plantas, usados largamente na indústria alimentar como espessantes: goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*), goma de guar (*Cyamopsis tetragonoloba*), goma de tara (*Cesalpinia spinosa*) e goma de cássia (*Cassia obtusifolia*) (Ramsden 2004). As diferenças principais entre estes galactomananos são a razão manose/galactose e a homogeneidade da distribuição dos resíduos de galactose ao longo da cadeia de manose, características que determinam as propriedades funcionais dos galactomananos (Dea *et al.* 1986; Dea *et al.* 1972; Fernandes *et al.* 1991).



#### 2.4.2 Estudo microscópico dos géis mistos

A descrição microscópica da estrutura dos géis mistos permite uma melhor compreensão do mecanismo de separação de fases, e das suas implicações nas propriedades funcionais dos géis. Neste contexto, a microscopia confocal de varrimento laser apresenta-se como a mais promissora ferramenta e tem sido, ultimamente, bastante utilizada (Gonçalves *et al.* 2004a; Loren *et al.* 1999; Olsson *et al.* 2002; Schmitt *et al.* 2001; Tromp *et al.* 2001; Van de Velde *et al.* 2003).

Apesar de não ser uma técnica nova (remonta ao século XIX), este tipo de microscopia apenas começou a ser aplicada nas ciências biológicas na década de 80 do século XX (Dürrenberger *et al.* 2001). Associada à sua boa resolução, este tipo de microscopia permite a observação de amostras com considerável espessura e a obtenção de imagens a três dimensões das amostras. A utilização da amostra hidratada com o mínimo de preparação, logo, o mínimo de alteração, é também uma vantagem relativamente a outros tipos de microscopia. Na microscopia confocal de varrimento laser, o contraste é normalmente obtido por diferenças de fluorescência, ou da auto-fluorescência do próprio material ou pela adição de corantes específicos. Esses corantes são adicionados à amostra e vão concentrar-se na fase pela qual têm maior afinidade, ou então, são previamente ligados covalentemente aos componentes da mistura. Neste último caso, a influência do corante no comportamento dos componentes deve ser tida em consideração (Dürrenberger *et al.* 2001; Van de Velde *et al.* 2003).

#### 2.5 Bibliografia

- Adler-Nissen J (1986) *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London, U.K.
- Alves MMPM (2001) Estrutura e comportamento reológico de gelatinas em associação com outras gomas alimentares Faculdade de Engenharia. Universidade do Porto, Porto, pp 102
- Bernal V, Jelen P (1985) Thermal stability of whey proteins - a calorimetric study. *Journal of Dairy Science* 68:2847-2852
- Boye JJ, Kalab M, Alli I, Ma CY (2000) Microstructural properties of heat-set whey protein gels: effect of pH. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 33:165-172
- Bremer LGB, Van Vliet T, Walstra PJ (1989) Theoretical and experimental study of the fractal nature of the structure of casein gels. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 85
- Bryant CM, McClements DJ (2000) Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denaturated whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloids* 14:383-390

- Chantrapornchai W, McClements DJ (2002) Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids* 16:467-476
- Clark AH (1992) Gels and Gelling. In: Schwartzberg HG, Hartel RW (eds) *Physical Chemistry of Foods*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 263-305
- Clark AH, Judge FJ, Richards JB, Stubbs JM, Suggett A (1981) Electron microscopy of network structures in thermally-induced globular protein gels. *International Journal of Peptide Research* 17:380-392
- Clark AH, Richardson RK, Robinson G, Ross-Murphy SB, Weaver AC (1982) Structure and mechanical properties of agar/BSA co-gels. *Progress in Food and Nutrition Science* 6:149-160
- Corredig M, Alexander M, Dalgleish DG (2004) The application of ultrasonic spectroscopy to the study of the gelation of milk components. *Food Research International* 37:557-565
- de Wit JN, Klarenbeek G (1984) Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science* 67:2701-2710
- Dea ICM, Clark AH, McCleary BC (1986) Effect of galactose substitution patterns on the interaction properties of galactomannans. *Carbohydrate Research* 147:275-294
- Dea ICM, McKinnon AA, Rees DA (1972) Tertiary and quaternary structure in aqueous polysaccharide systems which model cell cohesion: reversible changes in conformation and association of agarose, carrageenan and galactomannans. *Journal Molecular Biology* 68:153-172
- Doublier JL, Garnier C, Renard D, Sanchez C (2000) Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 5:202-214
- Doucet D, Gauthier SF, Foegeding EA (2001) Rheological characterization of a gel formed during extensive enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science* 66:711-715
- Dürrenberger MB, Handschin S, Conde-Petit B, Escher F (2001) Visualization of food structure by confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 34:11-17
- Eleya MMO, Ko S, Gunasekaran S (2004) Scaling and fractal analysis of viscoelastic properties of heat-induced protein gels. *Food Hydrocolloids* 18:315-323
- Eleya MMO, Turgeon LS (2000) The effects of pH on the rheology of  $\beta$ -lactoglobulin/ $\kappa$ -carrageenan mixed gels. *Food Hydrocolloids* 14:245-251
- Errington AD, Foegeding EA (1998) Factors determining fracture stress and strain of fine-stranded whey protein gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:2963-2967
- Fernandes PB, Gonçalves MP, Doublier JL (1991) A rheological characterization of kappa-carrageenan/galactomannan mixed gels: a comparison of locust bean gum samples. *Carbohydrate Polymers* 16:253-274
- Ferry JD (1980) *Viscoelastic properties of polymers*. John Wiley & Sons Inc., New York
- Foegeding EA, Davis JP, Doucet D, McGuffey MK (2002) Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology* 13:151-159
- Gonçalves MP, Sittikijyothin W, da Silva MV, Lefebvre J (2004a) A study of the effect of locust bean gum on the rheological behaviour and microstructure of a  $\beta$ -lactoglobulin gel at pH 7. *Rheologica Acta* no prelo

- Gonçalves MP, Torres D, Andrade CT, Azero EG, Lefebvre J (2004b) Rheological study of the effect of *Cassia javanica* galactomannans on the heat-set gelation of a whey protein isolate at pH 7. *Food Hydrocolloids* 18:181-189
- Gosal WS, Ross-Murphy SB (2000) Globular protein gelation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 5:188-194
- Grinberg VY, Tolstoguzov V (1997) Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids* 11:145-158.
- Hagiwara T, Kumagai H, Nakamura K (1998) Fractal analysis of aggregates in heat-induced BSA gels. *Food Hydrocolloids* 12:29-36
- Harada T, Matsuoka H (2004) Ultra-small-angle X-ray and neutron scattering study of colloidal dispersions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8:501-506
- Havea P, Carr AJ, Creamer LK (2004) The roles of disulphide and non-covalent bonding in the functional properties of heat-induced whey protein gels. *Journal of Dairy Research* 71:330-339
- Huang XL, Catignani GL, Swaisgood HE (1999) Modification of rheological properties of whey protein isolates by limited proteolysis. *Nahrung* 43:79-85
- Hudson HM, Daubert CR, Foegeding EA (2000) Rheological and physical properties of derivitized whey protein isolate powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:3112-3119
- Ikeda S (2003) Heat-induced gelation of whey proteins observed by rheology, atomic force microscopy, and Raman scattering spectroscopy. *Food Hydrocolloids* 17:399-406
- Ikeda S, Foegeding EA, Hagiwara T (1999) Rheological study on the fractal nature of the protein gel structure. *Langmuir* 15:8584-8589
- Ikeda S, Nishinari K, Foegeding EA (2001) Mechanical characterization of network formation during heat-induced gelation of whey protein dispersions. *Biopolymers* 56:109-119
- Ju ZY, Kilara A (1998) Gelation of hydrolysates of a whey protein isolate induced by heat, protease, salts and acids. *International Dairy Journal* 8:303-309
- Ju ZY, Otte J, Zakora M, Qvist KB (1997) Enzyme-induced gelation of whey proteins: effect of protein denaturation. *International Dairy Journal* 7:71-78
- Kavanagh GM, Clark AH, Ross-Murphy SB (2000a) Heat-induced gelation of globular proteins: 4. Gelation kinetics of low pH  $\beta$ -lactoglobulin gels. *Langmuir* 16:9584-9594
- Kavanagh GM, Clark AH, Ross-Murphy SB (2000b) Heat-induced gelation of globular proteins: part 3. Molecular studies on low pH  $\beta$ -lactoglobulin gels. *International Journal of Biological Macromolecules* 28:41-50
- Korhonen H, Philanto-Leppälä A, Rantamäki P, Tupasela T (1998) The functional and biological properties of whey proteins: prospects for the development of functional foods. *Agricultural and Food Science in Finland* 7:283-296
- Lefebvre T, Subirade M (2000) Molecular differences in the formation and structure of fine-stranded and particulate  $\beta$ -lactoglobulin gels. *Biopolymers* 54:578-586
- Liu TX, Relkin P, Launay B (1994) Thermal denaturation and heat-induced gelation properties of  $\beta$ -lactoglobulin. Effects of some chemical parameters. *Thermochimica Acta* 246:387-403
- Loren N, Langton M, Hermansson A-M (1999) Confocal laser scanning microscopy and image analysis of kinetically trapped phase-separated gelatin/maltodextrin gels. *Food Hydrocolloids* 13:185-198

- Lorient D (1988) Les propriétés fonctionnelles: interface entre propriétés physique, physico-chimique et sensorielle? In: Lorient D, Colas B, Le Meste M (eds) *Propriétés Fonctionnelles des Macromolécules Alimentaires*. Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation, Dijon, pp 1-7
- Marangoni AG, Barbut S, McGauley SE, Marcone S, Narine SS (2000) On the structure of particulate gels-the case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. *Food Hydrocolloids* 14:61-74
- Morris VJ, Mackie AR, Wilde PJ, Kirby ARE, Mills CN, Gunning AP (2001) Atomic force microscopy as a tool for interpreting the rheology of food biopolymers at the molecular level. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 34:3-10
- Nielsen PM (1995) Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. *Food Technology* 9:119-156
- Nishinari K (1997) Rheological and DSC study of sol-gel transition in aqueous dispersions of industrially important polymers and colloids. *Colloid and Polymer Science* 275:1093-1107
- Olsson C, Langton M, Hermansson A-M (2002) Dynamic measurements of  $\beta$ -lactoglobulin structures during aggregation, gel deformation and gel break-up in mixed biopolymer systems. *Food Hydrocolloids* 16:477-488
- Otte J, Ju ZY, Kilara A (1996) Protease-induced aggregation and gelation of whey proteins. *Journal of Food Science* 61:911-923
- Otte J, Lomholt SB, Ipsen RH, Qvist KB (2000) Effect of partial hydrolysis with an immobilized proteinase on thermal gelation properties of  $\beta$ -lactoglobulin B. *Journal of Dairy Research* 67:597-608
- Ramsden L (2004) Plant and algal gums and mucilages. In: Tomasik P (ed) *Chemical and Functional Properties of Food Saccharides*. CRC Press, Boca Raton
- Renard D, Lavenant L, Sanchez C, Hemar Y, Horne D (2002) Heat-induced flocculation of microparticulated whey proteins (MWP); consequences for mixed gels made of MWP and  $\beta$ -lactoglobulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 24:73-85
- Renkema JMS (2001a) Formation, structure and rheological properties of soy protein gels. Wageningen Universiteit, Wageningen, pp 1-14
- Renkema JMS (2001b) Formation, structure and rheological properties of soy protein gels. Wageningen Universiteit, Wageningen, pp 15-27
- Schmitt C, Sanchez C, Desorby-Banon S, Hardy J (1998) Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38:689-753
- Schmitt C, Sanchez C, Lamprecht A, Renard D, Lehr C-M, Kruif CG, Hardy J (2001) Study of  $\beta$ -lactoglobulin:acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 20:267-280
- Serov A, Antonov YA, Tolstoguzov V (1985) Isolation of lactic proteins in form of complexes with apple pectin. *Nahrung* 1:19-30
- Shih W-H, Shih WY, Kim S-I, Liu J, Aksay IA (1990) Scaling behaviour of the elastic properties of colloidal gels. *Physical Review A* 42:4772-4779
- Shimada K, Cheftel JC (1988) Texture characteristics, protein solubility and sulphhydryl group/dissulphide bond contents of heat induced gels of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36:1018-1025
- Stading M, Langton M, Hermansson A-M (1993) Microstructure and rheological behaviour of particulate  $\beta$ -lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids* 7:195-212

- Syrbe A, Fernandes PB, Dannenberg F, Bauer WJ, Klostermeyer H (1995) Whey protein + polysaccharide mixtures: Polymer incompatibility and its applications. In: Dickinson E, Lorient D (eds) *Food macromolecules and colloids*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 328-339
- Tromp RH, Van de Velde F, Van Riel J, Paques M (2001) Confocal scanning light microscopy (CSLM) on mixtures of gelatine and polysaccharides. *Food Research International* 34:931-938
- Turgeon LS, Beaulieu M (2001) Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 15:583-591
- Van de Velde F, Weinbreck F, Edelman MW, Van der Linden E, Tromp RH (2003) Visualisation of biopolymer mixtures using confocal scanning laser microscopy (CSLM) and covalent labelling techniques. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 31:159-168
- Van der Ven C (2002) Biochemical and functional characterisation of casein and whey protein hydrolysates. Wageningen Universiteit, Wageningen, pp 170
- Verheul M, Roefs SPFM (1998a) Structure of particulate whey protein gels: effect of NaCl concentration, pH, heating temperature, and protein composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:4909-4916
- Verheul M, Roefs SPFM (1998b) Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocolloids* 12:17-24
- Verheul M, Roefs SPFM, Mellema J, Kruif KG (1998) Power law behavior of structural properties of protein gels. *Langmuir* 14:2263-2268
- Winter HH, Mours M (1997) Rheology of polymers near liquid-solid transitions. *Advances in Polymer Science* 134:165-234
- Wu H, Morbidelli M (2001) A model relating structure of colloidal gels to their elastic properties. *Langmuir* 17:1030-1036
- Yong Z, Kilara A (1998) Gelation of pH-aggregated whey protein isolate solution induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:1830-1835
- Zasytkin DV, Dumay E, Cheftel JC (1996) Pressure- and heat-induced gelation of mixed  $\beta$ -lactoglobulin/xanthan solutions. *Food Hydrocolloids* 10:203-211



## **CAPÍTULO 3**

### **Estudo da gelificação de proteínas de soro de leite**

#### **Efeito da concentração e do grau de hidrólise**

##### **3.1 Materiais**

Durante o procedimento experimental usou-se um concentrado comercial de proteínas de soro de leite bovino, o Oragel HG80 da Armor Proteins (França), denominado ao longo deste trabalho por CPS80. A tripsina de pâncreas suíno (1020 U/mg proteína, 1 U catalisa a hidrólise de 1  $\mu$ mol de éster etílico de N- $\alpha$ -benzoil-L-arginina, BAEE) foi fornecida pela Sigma Chemical Co.

## 3.2 Métodos experimentais

### 3.2.1 Caracterização das amostras

#### 3.2.1.1 Teor em humidade e resíduo seco

O teor em humidade foi determinado aquecendo a amostra em estufa (103-105 °C) durante 12 horas, avaliando posteriormente a perda de peso, tal como descrito pelo *Food Chemical Codex* (FCC 1981a).

#### 3.2.1.2 Teor em cinzas

O teor em cinzas foi determinado pela incineração da amostra em mufla (550 °C), de acordo com o método descrito pelo *Food Chemical Codex* (FCC 1981b).

#### 3.2.1.3 Teor em proteínas

O teor proteico das amostras foi determinado após quantificação do azoto total e multiplicado o resultado pelo factor de conversão 6,38. O azoto total foi quantificado pelo método de Kjeldhal descrito pelo *Official Methods of Analysis* (AOAC 1975).

#### 3.2.1.4 Análise cromatográfica dos preparados proteicos

A análise do CPS e dos seus hidrolisados trípticos (HT) foi feita utilizando a cromatografia líquida de alta performance numa coluna de fase reversa de acordo com o método já publicado (Mota *et al.* 2004).

Para a análise, usou-se uma unidade de HPLC (Jasco) equipada com duas bombas (PU-980), um detector ultra-violeta (UV-970) e um injector Rheodyne 7125 (volume de injeção 20 µL).

Na separação, usou-se uma coluna de fase reversa (Chrompack P 300 RP) com um copolímero de polistireno-divinilbenzeno como fase estacionária (8 µm, 300 Å, 150×4,6 mm de diâmetro interno). O sistema continha, ainda, uma pré-coluna Chrompack P RP (24×4,6 mm de diâmetro interno).

A fase móvel consistiu numa mistura de dois solventes [solvente A: solução aquosa de ácido trifluoracético 0,1% (v/v); solvente B: solução de ácido trifluoracético 0,1% (v/v) numa mistura aquosa com 80% de acetonitrilo (v/v)] de acordo com o seguinte gradiente: 0-1 min, 90% A; 1-10 min, 90-80% A; 10-15 min, 80-75% A; 15-20 min,



75-60% A; 20-30 min, 60-50% A; 30-33 min, 50-40% A; 33-36 min, 40-30% A; 36-39 min, 30-20% A; 39-41 min, 20-0% A. Voltando às condições iniciais após 9 min.

O caudal foi de 0,5 mL/min e a detecção efectuada a 215 nm.

### **3.2.2 Hidrólise enzimática do CPS80**

Foi preparada uma suspensão de CPS80 em água destilada (50 g/L). A dispersão foi colocada num reaktor tipo *bacth* de 500 mL, equipado com controlo de temperatura e de pH. O meio foi aquecido a 37 °C e o pH ajustado a 8 com NaOH 1 M. Após a adição de tripsina ao meio (0,2 g/L), foi monitorizado o percurso da hidrólise, mantendo o pH constante com a adição de NaOH, de acordo com o método pH stat (Adler-Nissen 1986). Após a hidrólise, a enzima foi inactivada aquecendo o meio a 70 °C durante 5 minutos. No final, o pH foi novamente corrigido. O grau de hidrólise final foi calculado tendo como base o volume total da solução de NaOH consumido para manter o pH constante.

Foram liofilizadas cinco suspensões num liofilizador CHRIST Alpha 2-4 (B. Braun Biotech International, Osterode/Harz, Alemanha) com 5 graus de hidrólise distintos (0,9; 2,2; 2,5; 2,8 e 4,2%).

### **3.2.3 Estudo da gelificação**

#### *3.2.3.1 Preparação das dispersões proteicas*

As dispersões proteicas foram feitas adicionando lentamente os ingredientes proteicos (CPS e hidrolisados liofilizados) a uma solução tampão fosfato (pH 7,0; força iónica 19 mM). A hidratação das proteínas ocorreu à temperatura ambiente durante 3 horas, sob agitação lenta. A força iónica do meio foi ajustada a 220 mM com adição de NaCl.

#### *3.2.3.2 Ensaios reológicos*

Os ensaios reológicos foram efectuados num reómetro de tensão controlada AR2000 (TA Instruments, Delaware, EUA) equipado com uma geometria tipo prato-prato, feita em acrílico, de superfície rugosa (40 mm de diâmetro). A distância entre o prato inferior e o prato de acrílico foi de 0,5 mm, o que corresponde a um volume de amostra de ~ 0,7 mL. Antes do início da experiência, as amostras foram cobertas com uma fina camada de parafina líquida de modo a evitar a evaporação do solvente.

Cada amostra foi submetida a uma rampa de temperatura (2 °C/min) de 20 a 80 °C. Aí, a temperatura manteve-se constante durante 3,5 horas. Ao fim deste período, foi registado um espectro mecânico (varrimento em frequência) entre 0,06283 e 62,83 rad.s<sup>-1</sup>. A amostra foi então arrefecida a 20 °C durante 30 minutos. A essa temperatura, foi monitorizada a evolução das propriedades mecânicas da amostra durante 1 hora. Um novo espectro mecânico, desta vez a 20 °C, foi registado entre 0,06283 e 62,83 rad.s<sup>-1</sup>. Finalmente, foi feito um varrimento em deformação (0,01-500%) de forma a determinar o limite da zona de viscoelasticidade linear. Durante as rampas de temperatura e as cinéticas a 80 e a 20 °C foi imposta uma amplitude de deformação máxima de 1% com uma frequência de 6,283 rad.s<sup>-1</sup>.

Para verificar se os espectros mecânicos foram determinados dentro da zona de viscoelasticidade linear em toda a gama de frequência, usou-se uma aproximação do equivalente mecânico de Kronig-Kraemers (Tschoegl 1989):

$$G''(\omega) = \frac{\pi G'(\omega)}{2} \frac{d \ln G'(\omega)}{d \ln \omega}, \quad [\text{III.1}]$$

para calcular  $G''(\omega)$  a partir dos valores experimentais de  $G'(\omega)$ . Os valores calculados foram comparados com os valores experimentais. O segundo termo é o declive, a qualquer frequência, da representação logarítmica de  $G'$  versus  $\omega$  (Barnes 2000).

### 3.2.3.3 Estatística

O CPS foi estudado isoladamente. A gelificação e as propriedades dos géis foram estudadas em função da concentração ( $4 < C < 12\%$ , p/p). As concentrações 4, 6 e 12% foram estudadas em duplicado, o coeficiente de variação (c.v, desvio padrão/média\*100) não excedeu 7%.

Para estudar o efeito da concentração ( $C$ ) e do grau de hidrólise ( $GH$ ) nas propriedades dos géis de hidrolisados tripticos de proteínas do soro, foi elaborado um desenho experimental com as duas variáveis independentes ( $C$  e  $GH$ ), com cinco níveis cada, de acordo com a figura 3.12b.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Caracterização das amostras

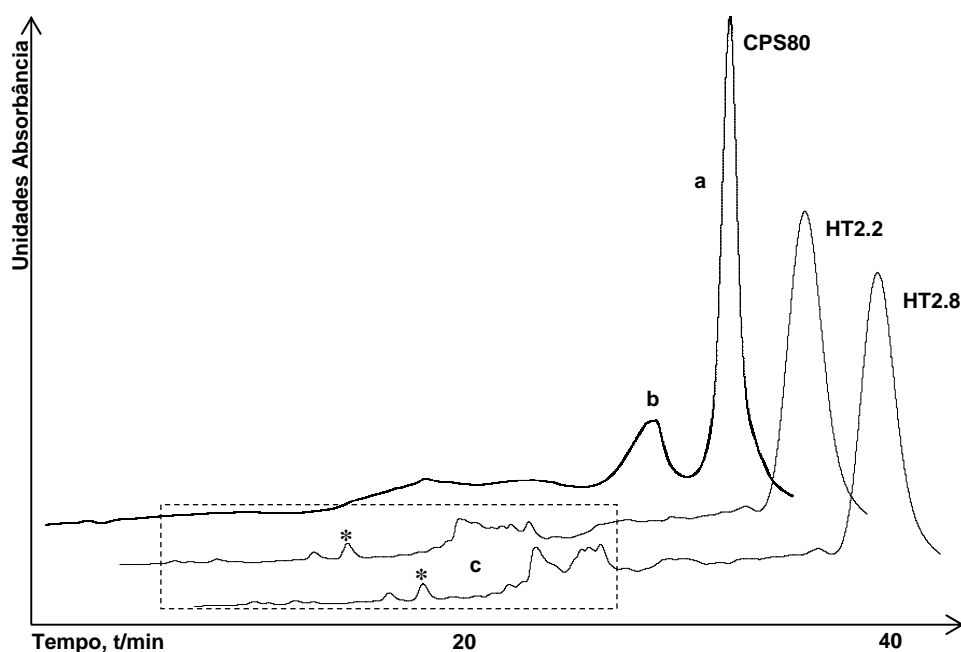
A composição do CPS80 e seus hidrolisados enzimáticos é apresentada na tabela 3.1.

**Tabela 3.1** Composição das amostras (% p/p)

	<b>Humidade</b> (c.v < 3,0%)	<b>Cinzas</b> (c.v < 4,0%)	<b>Proteína</b> (c.v < 0,1%)
CPS80	10,4	3,3	69,6
HT0.9	7,9	4,0	71,8
HT2.2	7,5	4,8	70,5
HT2.5	8,4	4,4	69,6
HT2.8	8,2	5,0	69,4
HT4.2	8,3	5,1	69,3

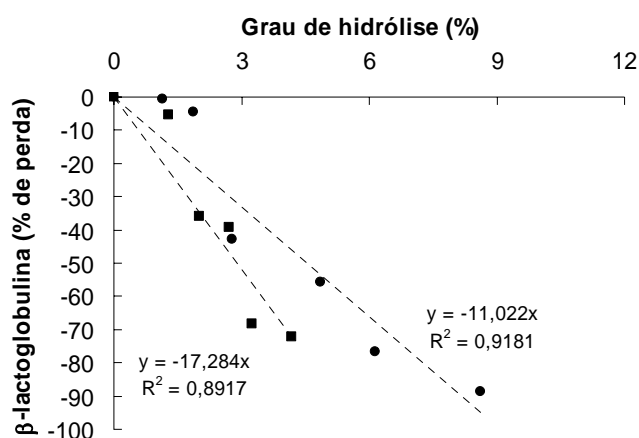
#### 3.3.2 Hidrólise enzimática do CPS80

O estudo cromatográfico dos hidrolisados proteicos revelou que a  $\alpha$ -lactalbumina é facilmente degradada pela tripsina, aparecendo apenas em quantidades vestigiais em hidrolisados com grau de hidrólise superior a 1%. A hidrólise da  $\beta$ -lactoglobulina é, relativamente, mais lenta. O hidrolisado com grau de hidrólise 4,2% (HT4.2) contém ainda ~30% de  $\beta$ -lactoglobulina não hidrolisada. Os péptidos formados por hidrólise das proteínas ou de outros péptidos de maior tamanho eluem entre os 9 e os 32 minutos. Nas condições cromatográficas aplicadas, alguns péptidos são bem separados, o que permitiu recolher o péptido assinalado na figura 3.2 para sequenciação e identificação (trabalho em curso). Várias foram as razões que levaram à escolha deste pico: a) é um pico bem separado; b) tem uma área considerável e c) tem um tempo de eluição curto o que leva a prever um peso molecular baixo, logo, uma cadeia de aminoácidos curta, o que aumenta as possibilidades de ser um dos péptidos com actividade biológica apresentados na tabela 1.6 (página 14). Um estudo pormenorizado sobre este processo de hidrólise foi recentemente publicado por Mota (Mota *et al.* 2004).



**Figura 3.2** Cromatogramas do CPS e de dois hidrolisados tripticos (HT2.2 e HT2.8). (a)  $\beta$ -lactoglobulina; (b)  $\alpha$ -lactalbumina; (c) zona de eluição de péptidos não identificados. \* péptido recolhido.

Num estudo prévio, onde se quantificou por HPLC a  $\beta$ -lactoglobulina ao longo da hidrólise catalisada pela tripsina a pH 8 e pH 9, verificou-se que, para graus de hidrólise inferiores a 10%, a especificidade da enzima é, aparentemente, alterada pelo pH do meio pois, apesar do grau de hidrólise ser semelhante (o que indica um número semelhante de ligações peptídicas quebradas), a  $\beta$ -lactoglobulina parece ser mais rapidamente degradada a pH 8 (figura 3.3).



**Figura 3.3** Grau de hidrólise (pH stat) vs degradação da  $\beta$ -lactoglobulina (HPLC). (■) Hidrólise a pH 8; (●) Hidrólise a pH 9.

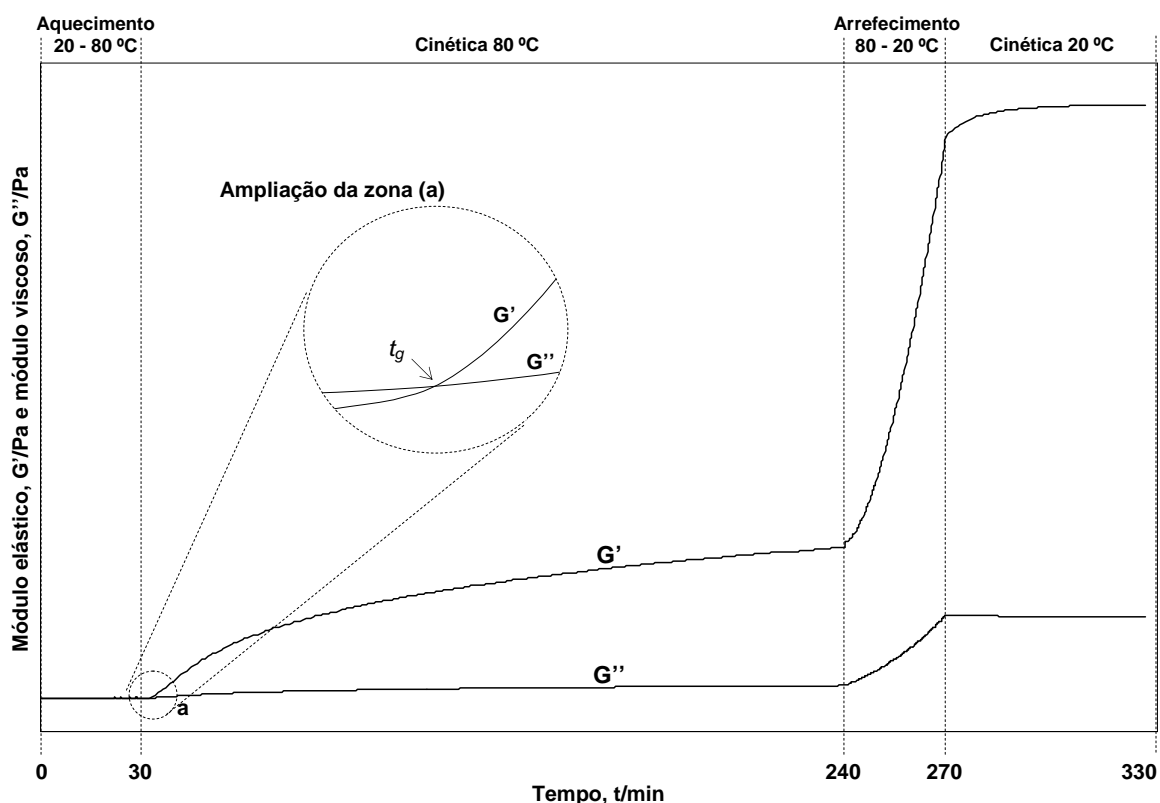
### 3.3.3 Ensaios reológicos - Estudo da gelificação do CPS80

#### 3.3.3.1 Esquema geral

O esquema geral dos ensaios reológicos efectuados é apresentado nas figuras 3.4, 3.5 e 3.6. A figura 3.4 mostra a evolução do módulo elástico ( $G'$ ) e do módulo viscoso ( $G''$ ) ao longo do programa de temperatura a que foram submetidas as suspensões proteicas. Durante o aquecimento das suspensões,  $G''$  era ligeiramente superior a  $G'$ , revelando a natureza líquida do material e a inexistência de pré-agregação das moléculas proteicas (Kavanagh *et al.* 2000). O cruzamento dos módulos aconteceu, geralmente, durante a cinética a 80 °C. Este momento foi definido como o tempo de gelificação ( $t_g$ ). Após o estabelecimento da ténue rede tridimensional, no momento da gelificação, as moléculas até aí presentes na fase *sol* vão-se agregando, reforçando a rede, o que faz aumentar a sua elasticidade (processo de cura). Nesse período, numa primeira fase, ocorre um aumento acentuado do  $G'$ . Nesta zona do gráfico, definiu-se a taxa de gelificação inicial como a derivada  $dG'/dt$  nos primeiros 30 minutos de gelificação ( $dG'/dt_{ini}$ ). A taxa de gelificação tende a diminuir ao longo da cinética atingindo nos últimos 30 minutos um valor mais baixo que se definiu como a taxa de gelificação final ( $dG'/dt_{fin}$ ).

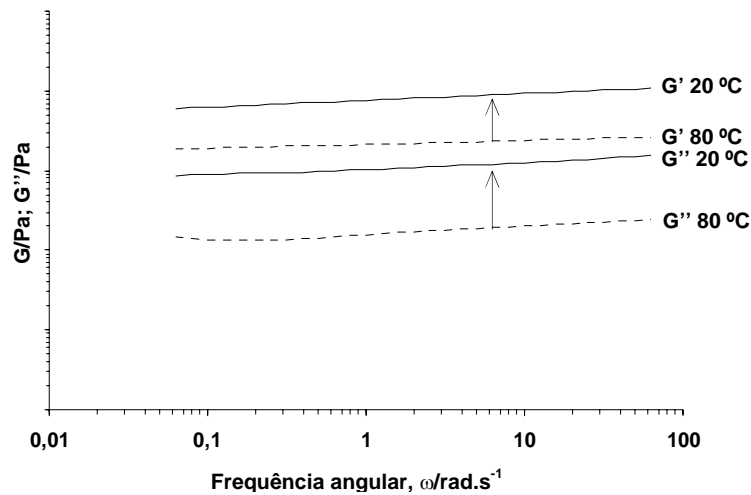
Após esta cinética, efectuou-se um espectro mecânico (apresentado na figura 3.5) seguindo-se o arrefecimento do gel até 20 °C. O arrefecimento é acompanhado por uma subida acentuada dos módulos  $G'$  e  $G''$  o que revela, tal como já foi discutido no capítulo 2, o fortalecimento das interacções não covalentes, em grande medida, pontes de hidrogénio, entre as partículas que constituem o gel (Aguilera 1995; Gonçalves *et al.* 2004; Lefèbvre e Subirade 2000). A diferença relativa entre os valores dos módulos a 80 e a 20 °C poderá dar uma indicação sobre a contribuição das forças referidas na estabilização da estrutura do gel, enquanto que, a diferença em  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ) indicará se o arrefecimento acentuou ou não o “carácter” sólido do gel.

O aumento dos módulos ao longo da rampa de diminuição da temperatura de 80 para 20 °C (dos 240 aos 270 minutos de ensaio) ajusta-se bem a um polinómio de 2ª ordem, sendo, o seu comportamento, praticamente linear a partir dos 60 °C (250 min). Após 60 minutos de estabilização, os módulos atingem um valor aparentemente constante e neste estado de pseudo-equilíbrio é efectuado um novo espectro mecânico (figura 3.5).



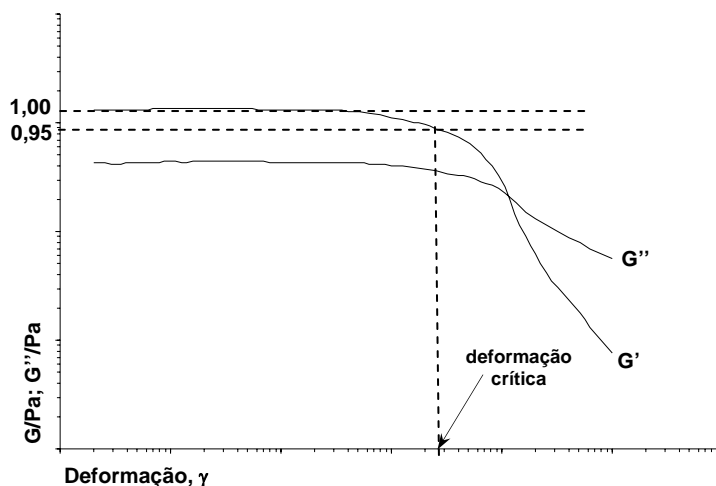
**Figura 3.4** Esquema geral do comportamento do módulo elástico ( $G'$ /Pa) e do módulo viscoso ( $G''$ /Pa) ao longo do ensaio reológico. (a) tempo de gelificação ( $t_g$ ), definido como o momento em que  $G' = G''$  (ver ampliação).

Um espectro mecânico revela o comportamento dos módulos, elástico e viscoso, em função da frequência de oscilação. A dependência do módulo elástico e do módulo viscoso dos géis, em relação à frequência angular ( $\omega$ ), pode ser descrita como  $G' \propto \omega^{n'}$  e  $G'' \propto \omega^{n''}$ . Num gel químico, onde as ligações são exclusivamente covalentes, os módulos são independentes da frequência ou seja  $n' = n'' = 0$ . Nos géis físicos, como normalmente são denominados os géis de proteínas (devido à natureza das interações que suportam a estrutura), a dependência é mínima com  $n' = n'' > 0$  (Doucet *et al.* 2001).



**Figura 3.5** Esquema geral dos espectros mecânicos. ---- 240 min (80 °C); — 330 min (20 °C). As setas indicam o aumento de cada um dos módulos, medidos a 6,283 rad.s<sup>-1</sup>, com a diminuição da temperatura.

Finalmente, os géis foram submetidos a um varrimento em deformação (figura 3.6). Os módulos  $G'$  e  $G''$  permaneciam praticamente constantes até que, a uma certa deformação, começam a decrescer à medida que a deformação aumenta. Esta variação brusca indica a quebra de ligações que suportam a estrutura do gel e a transição entre o regime linear ( $\sigma \propto \gamma$ ) e o regime não linear. A deformação limite ou crítica ( $\gamma_c$ ) foi determinada como a deformação à qual o módulo  $G'$  varia mais de 5% relativamente ao valor constante inicial (figura 3.6) (Eleya *et al.* 2004).



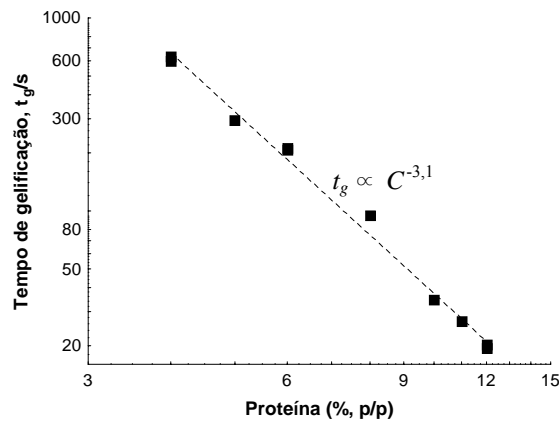
**Figura 3.6** Esquema geral da análise ao ensaio de varrimento em deformação

### 3.3.3.2 Gelificação do CPS80 – efeito da concentração de proteína

A gelificação do CPS80 foi estudada na gama de concentrações entre 4 e 12% (p/p, base proteica).

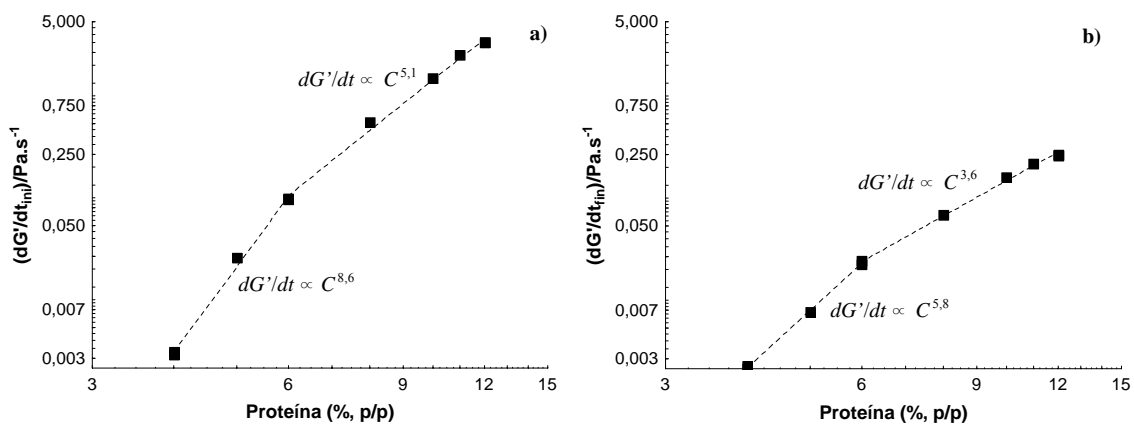
Na figura 3.7, onde é apresentada a variação do tempo de gelificação ( $t_g$ ) em função da concentração de proteína, é evidente uma relação de potência com expoente -3,1 em toda a gama de concentração estudada. Este valor é inferior ao valor -1 (quando  $C \gg C_0$ ) proposto por Clark (1992) depois da simulação computacional baseada no modelo cinético simples de Flory-Stockmayer para a gelificação isotérmica e agregação reversível. Segundo este modelo, este expoente tende para  $-\infty$  quando  $C \rightarrow C_0$  (Clark 1992). Expoentes mais negativos que -1 já foram apresentados por outros autores e explicados por Ross-Murphy (1991). Segundo este autor, o modelo cinético simples de Flory-Stockmayer parte do pressuposto que todos os potenciais locais de inter-ligação serão efectivos o que, na prática, não se verifica (pode ocorrer intra-ligação molecular) (Ross-Murphy 1991). Neste estudo, acrescenta-se o facto do processo de gelificação utilizado não ser isotérmico (tem uma fase de aquecimento de 30 minutos antes dos 80 °C), o que poderá também contribuir para esta diferença.





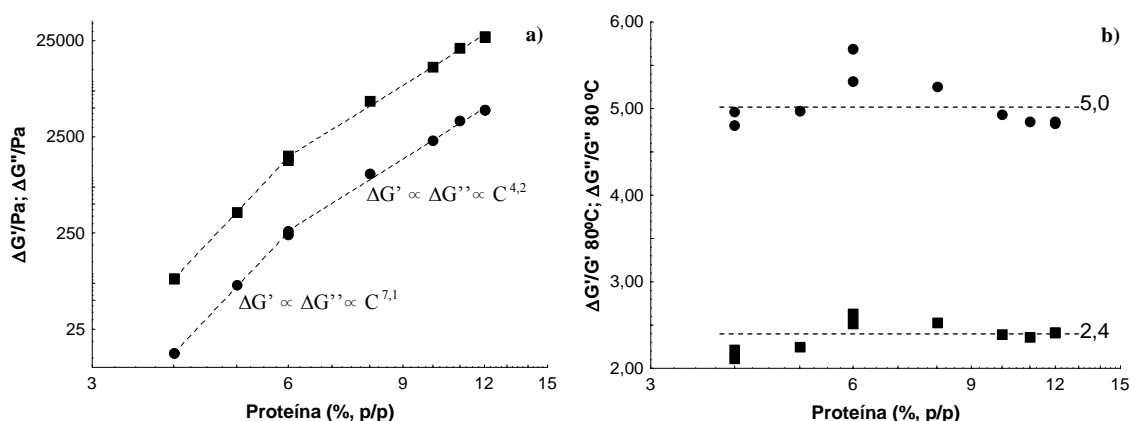
**Figura 3.7** Relação entre o tempo de gelificação ( $t_g$ ) e a concentração de proteína

A taxa de gelificação inicial do CPS (figura 3.8) varia em função da concentração de proteína, a sua variação respeita a relação  $dG'/dt \propto C^n$ , com o expoente  $n$  aumentando quando  $C \rightarrow C_0$ . A taxa de gelificação final, embora com valores significativamente inferiores, apresenta um comportamento semelhante. No tratamento efectuado definiram-se, empiricamente, dois regimes, o primeiro de 4 a 6% de proteína e o segundo de 6 a 12%. Este procedimento, repetido ao longo das próximas figuras, tem como objectivos: 1) evidenciar o aumento do expoente da potência à medida de  $C \rightarrow C_0$ ; 2) melhorar o ajuste das duas funções potência relativamente ao obtido se for considerada toda a gama de concentração estudada.



**Figura 3.8** (a) Relação entre a taxa de gelificação inicial e a concentração de proteína; (b) Relação entre a taxa de gelificação final e a concentração de proteína

A figura 3.9 apresenta a diferença entre o valor dos módulos  $G'$  e  $G''$  antes e após o arrefecimento dos géis de 80 para 20 °C (no início e no fim da rampa de arrefecimento). A diferença entre o valor dos módulos  $G'$  e  $G''$  varia, mais uma vez, de acordo com a relação  $\Delta G' \propto C^n$ , com o expoente a aumentar quando  $C \rightarrow C_0$ . Relativamente a este parâmetro, comparando os dois módulos, verifica-se que o valor do expoente das funções potência definidas é o mesmo, nos diferentes regimes estudados (figura 3.9a). Tendo por base o valor dos módulos no início do arrefecimento (ainda a 80 °C) verifica-se que, no fim do arrefecimento, o módulo  $G'$  (20 °C)  $\sim 2,4 \pm 0,2 G'$  (80 °C) enquanto que o módulo  $G''$  (20 °C)  $\sim 5,0 \pm 0,3 G''$  (80 °C) (figura 3.9b). Apesar desta variação relativa dos módulos ser, sensivelmente, independente da concentração, nota-se, no entanto, uma ligeira tendência crescente entre 4 e 6% de proteína, invertendo-se a tendência para concentrações de proteína superiores a 6%. Contudo, de uma forma global, não será incorrecto afirmar que a proporção de todas as forças envolvidas na manutenção da estrutura do gel (ligações covalentes, interacções hidrofóbicas, pontes de hidrogénio e interacções electrostáticas) é, nas condições estudadas, independente da concentração das proteínas do soro. O superior aumento relativo do  $G''$  leva a que  $\tan \delta$  aumente cerca de 0,06 o que corresponde a um aumento de  $\delta$  de aproximadamente 3,6°, ou seja, durante o arrefecimento o gel perde, ligeiramente, o “carácter” sólido.



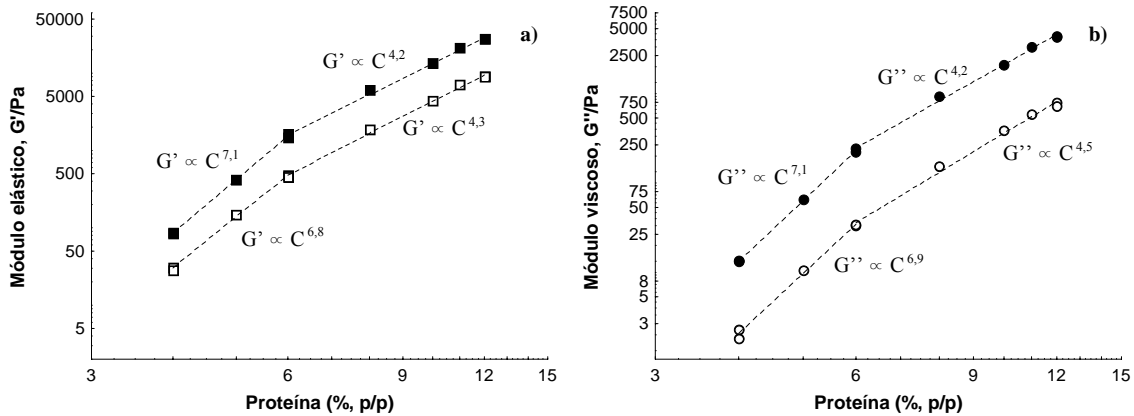
**Figura 3.9** (a) Variação de  $G'$  e  $G''$  com a diminuição de temperatura (80  $\rightarrow$  20 °C) em função da concentração de proteína. ■  $\Delta G'$ ; ●  $\Delta G''$ . (b) Variação relativa do  $G'$  (■) e  $G''$  (●) com a diminuição de temperatura (80  $\rightarrow$  20 °C) em função da concentração de proteína.

Os espectros mecânicos obtidos durante a caracterização dos géis a 80 °C e, posteriormente, a 20 °C, são genericamente apresentados na figura 3.5. Nesta fase, de forma a facilitar a discussão, serão apresentados os valores de  $G'$  e  $G''$  (medidos a

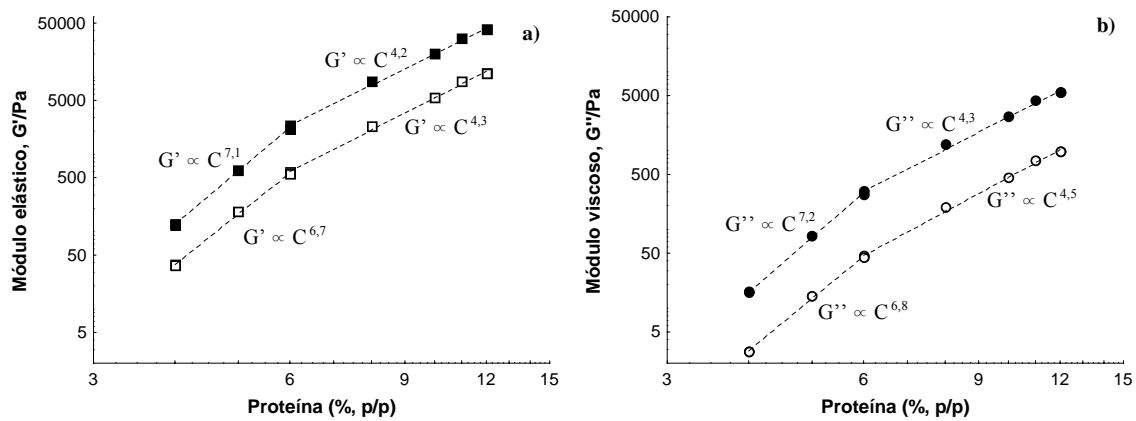
0,06283; 6,283 e 62,83 rad.s<sup>-1</sup>) em função da concentração e também os expoentes  $n'$  e  $n''$  relativos às relações  $G' \propto \omega^{n'}$  e  $G'' \propto \omega^{n''}$  (0,06283 rad.s<sup>-1</sup> <  $\omega$  < 62,83 rad.s<sup>-1</sup>).

O módulo  $G'$ , dentro da gama de frequência estudada, varia segundo a relação  $G' \propto C^n$ , tal como discutido no capítulo 2, sendo que, o valor de  $n$  aumenta quando  $C \rightarrow C_0$ . A 20 °C e  $\omega = 6,283$  rad.s<sup>-1</sup> (figura 3.11a), verifica-se que  $n \sim 7,1$  quando  $4\% < C < 6\%$  e  $n \sim 4,2$  quando  $6\% < C < 12\%$ . Num estudo semelhante Verheul e Roefs, calcularam, para isolado de proteínas do soro (pH de  $6,9 \pm 0,1$  e várias forças iónicas), um valor de  $n \sim 4,5$  quando  $3,5\% < C < 8,9\%$ . Esse valor de  $n$ , de acordo com o estudo em questão, independente da força iónica do meio, está próximo do valores obtido neste estudo quando  $6\% < C < 12\%$  (Verheul e Roefs 1998b). A 80 °C, o comportamento do  $G'$  em função da concentração é semelhante, apenas com uma ligeira diferença nos valores de  $n$ . Os valores de  $G''$  variam também de acordo com a relação  $G'' \propto C^n$ , de uma maneira muito semelhante à variação do  $G'$  (figura 11b).

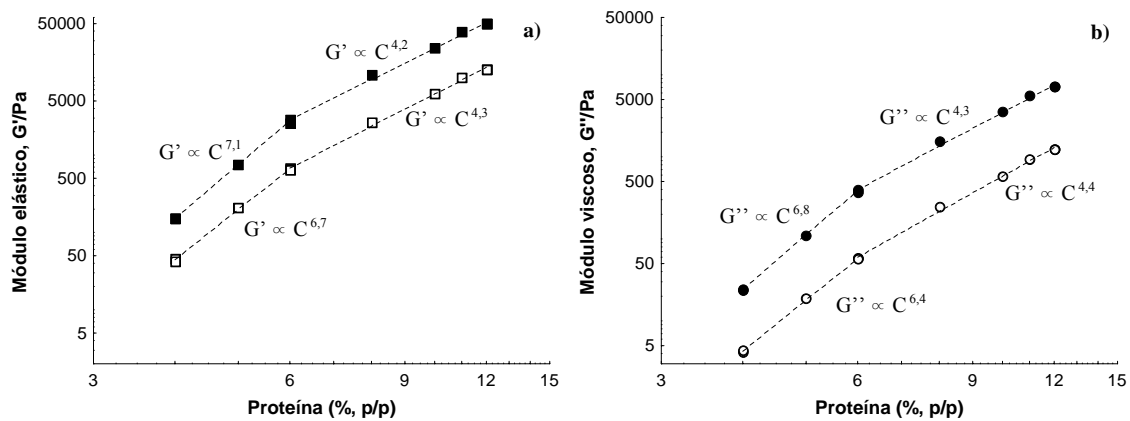
Pela comparação dos valores de  $n$  entre as figuras 3.10, 3.11 e 3.12, conclui-se que  $n$  é sensivelmente independente da frequência, contudo o valor de  $n$  da expressão  $G'' \propto C^n$ , sofre uma ligeira diminuição quando  $G''$  é medido a altas frequências e baixas concentrações ( $4\% < C < 6\%$ , figura 3.12). Estas observações confirmam a relativa independência dos módulos em função da frequência.



**Figura 3.10** (a)  $G'$  medido a 0,06283 rad.s<sup>-1</sup> durante os espectros mecânicos a 80 e a 20 °C em função da concentração de proteína. □  $G'$  80 °C; ■  $G'$  20°C. (b)  $G''$  medido a 0,06283 rad.s<sup>-1</sup> durante os espectros mecânicos a 80 e a 20 °C em função da concentração de proteína. ○  $G''$  80 °C; ●  $G''$  20 °C.



**Figura 3.11** (a)  $G'$  medido a 6,283 rad.s<sup>-1</sup> durante os espectros mecânicos a 80 e a 20 °C em função da concentração de proteína. □  $G'$  80 °C; ■  $G'$  20 °C. (b)  $G''$  medido a 6,283 rad.s<sup>-1</sup> durante os espectros mecânicos a 80 e a 20 °C em função da concentração de proteína. ○  $G''$  80 °C; ●  $G''$  20 °C.

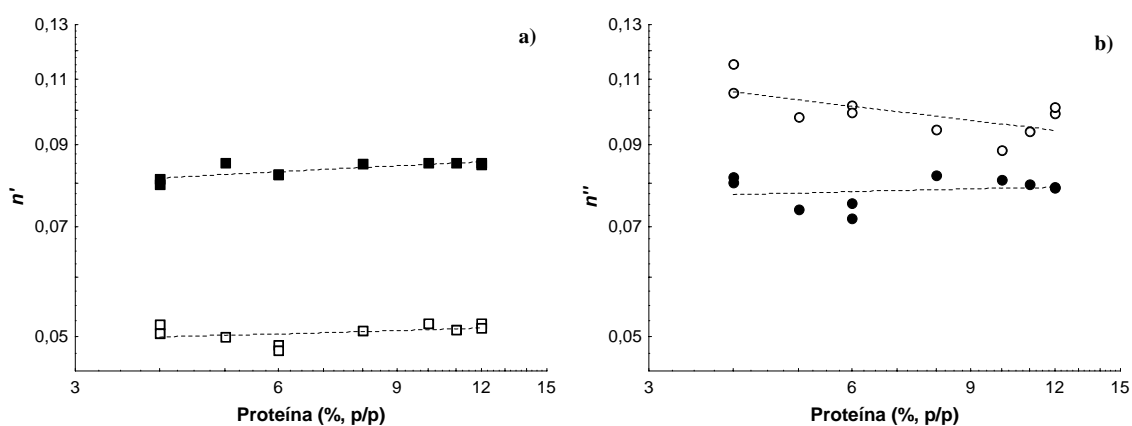


**Figura 3.12** (a)  $G'$  medido a 62,83 rad.s<sup>-1</sup> durante os espectros mecânicos a 80 e a 20 °C em função da concentração de proteína. □  $G'$  80 °C; ■  $G'$  20 °C. (b)  $G''$  medido a 62,83 rad.s<sup>-1</sup> durante os espectros mecânicos a 80 e a 20 °C em função da concentração de proteína. ○  $G''$  80 °C; ●  $G''$  20 °C.

Os valores de  $n'$  e  $n''$  resultantes das relações  $G' \propto \omega^{n'}$  e  $G'' \propto \omega^{n''}$  obtidas durante os espectros mecânicos a 80 e a 20 °C são apresentados nas figuras 3.13a e 3.13b, respectivamente. Estes valores são sensivelmente, independentes da concentração de proteína. O valor de  $n'$  aumenta de  $0,05 \pm 0,001$ , a 80 °C, para  $0,08 \pm 0,002$  a 20 °C (figura 3.13a). Esta observação vem confirmar a ligeira perda do “carácter” sólido que ocorre durante o arrefecimento, fenómeno já referido quando se analisou a evolução da  $\tan \delta$ . Se  $n' \rightarrow 0$ , à medida que a fracção das interações covalentes envolvidas na estrutura do gel  $\rightarrow 1$  (Doucet *et al.* 2001), podemos afirmar que a fracção das interações covalentes

diminui ao longo do arrefecimento, o que vem apoiar a hipótese do incremento das interações do tipo não covalente, principalmente, pontes de hidrogénio, durante o arrefecimento do gel.

Outros autores indicaram, para géis de isolados de proteínas de soro, obtidos por aquecimento, um  $n'$  de 0,067 e 0,070, valores dentro da mesma ordem de grandeza que os descritos neste estudo (Doucet *et al.* 2001; Verheul e Roefs 1998a). O valor de  $n''$ , mais irregular, principalmente a 80 °C, varia no sentido oposto ao de  $n'$ . Diminui de  $0,10 \pm 0,007$  para  $0,08 \pm 0,003$  quando o gel é arrefecido (figura 3.13b).



**Figura 3.13** (a) valor  $n'$  obtido pela análise do espectro mecânico dos géis, em função da concentração de proteína. □  $n'$  80 °C; ■  $n'$  20 °. (b) valor  $n''$  obtido pela análise do espectro mecânico dos géis, em função da concentração de proteína. ○  $n''$  80 °C; ●  $n''$  20 °C.

A figura 3.14 apresenta o resultado da deformação crítica dos géis, obtida segundo o esquema da figura 3.6, em função da concentração de proteína. De acordo com Shih *et al.* (1990), ao analisar a relação  $\gamma_c \propto C^m$ , podemos dividir o comportamento de um gel em dois regimes, o regime fraco e o regime forte. No regime forte, as forças inter-agregado são superiores às forças intra-agregado; no regime fraco, acontece o oposto. No regime fraco,  $\gamma_c$  aumenta à medida que  $C$  aumenta ( $m > 0$ ) enquanto que, no regime forte,  $\gamma_c$  diminui com o aumento de  $C$  ( $m < 0$ ) (Shih *et al.* 1990). Um gel pode passar do regime fraco para o regime forte aumentando a concentração de proteína passando, obviamente, por regimes de transição onde as forças inter- e intra-agregados se assemelham (Wu e Morbidelli 2001). A análise dos dados obtidos permite concluir que, nas condições experimentais utilizadas, quando  $C < 5\%$  os géis de proteínas do soro

estão no regime fraco. Embora pareça evidente esta afirmação, seria interessante ter mais pontos experimentais neste regime. Quando  $C > 5\%$ ,  $m \sim -1,9$  (regime forte), sendo este valor ligeiramente mais negativo que o valor -1,8 obtido para géis de clara de ovo ( $5\% < C < 20\%$ , pH 9,0) (Eleya *et al.* 2004) mas bastante mais negativo que os valores obtidos para géis de isolados de proteínas de soro: -0,85 (25 mM NaCl), -0,16 (100 mM NaCl) e -0,86 (500 mM NaCl) a pH 7,0 (Ikeda *et al.* 1999). Nesse estudo, a deformação limite foi determinada durante um teste de torsão de grande deformação.

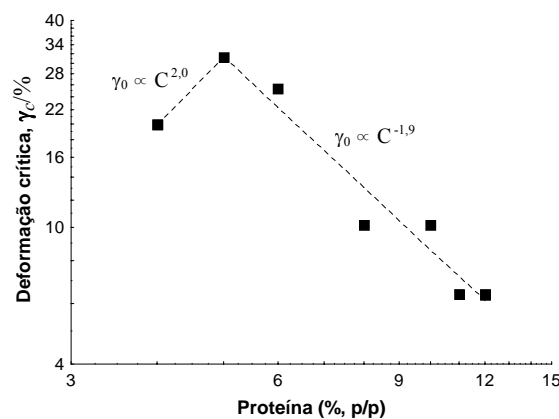


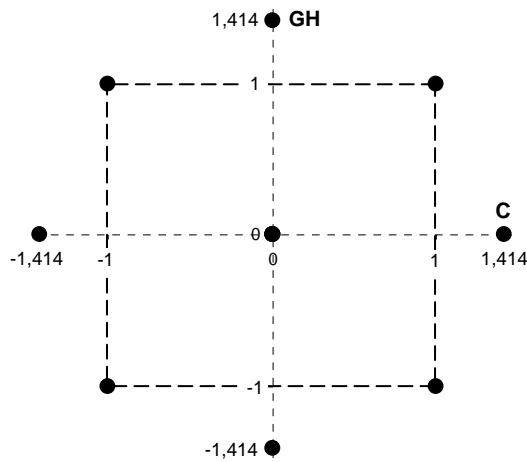
Figura 3.14 Deformação crítica dos géis ( $\gamma_c$ ) em função da concentração de proteína de soro

### 3.3.4 Ensaios reológicos - Estudo da gelificação dos hidrolisados trípticos

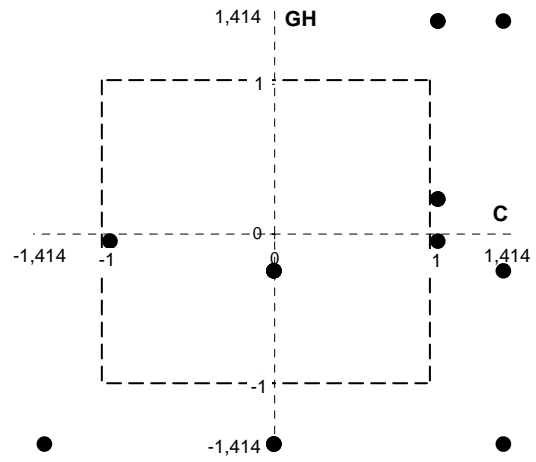
#### 3.3.4.1 Planeamento experimental

Alguns dos parâmetros de gelificação descritos até agora nos géis de CPS80, serão agora estudados em géis de hidrolisados trípticos (HT). A gama de concentração estudada ( $C$ ) situa-se entre 10 e 17% enquanto que o grau de hidrólise ( $GH$ ) se situa entre 0,9 e 4,2%.

O desenho experimental elaborado teve por base o *planeamento em estrela* (figura 3.15a). No entanto, devido à impossibilidade de obter os graus de hidrólise que satisfizessem os pontos experimentais propostos pelo *planeamento em estrela*, houve necessidade de introduzir alterações ao desenho, garantindo uma satisfatória uniformidade no preenchimento do espaço experimental (figura 3.15b).



**Figura 3.15a.** Representação esquemática do desenho experimental (*Planeamento em estrela*) com duas variáveis e cinco níveis. Variáveis codificadas.



**Figura 3.15b.** Representação esquemática do desenho experimental aplicado com duas variáveis e cinco níveis. Variáveis codificadas.

Alguns pontos foram repetidos de forma a estimar o erro experimental (tabela 3.2). As variáveis  $C$  e  $GH$  foram codificadas como  $c$  e  $gh$  de acordo com as equações,

$$c_i = \frac{(C_i - C_0) \times 2\alpha}{\Delta C}, \text{ e} \quad [\text{III.2}]$$

$$gh_i = \frac{(GH_i - GH_0) \times 2\alpha}{\Delta GH} \quad [\text{III.3}]$$

onde  $i = 1, 2, 3, 4, 5$ ,  $c_i$  e  $gh_i$  são os valores codificados adimensionais,  $C_i$  e  $GH_i$  correspondem aos valores reais das variáveis,  $C_0$  e  $GH_0$  correspondem aos pontos centrais reais (13,5% e 2,5% respectivamente),  $\alpha = 1,414$  e  $\Delta C$  e  $\Delta GH$  são as amplitudes reais das variáveis (7% e 3,3% respectivamente).

A partir das experiências efectuadas, foram calculados modelos empíricos nos quais os parâmetros estudados do gel ( $t_g$ ,  $G'$ ,  $G''$ ,  $\tan \delta$ ,  $\gamma_c$ , etc) são funções das variáveis  $c$  e  $gh$ . Foram usados modelos quadráticos que consideram os efeitos (lineares e quadráticos) de cada variável e o efeito de interacção das duas variáveis na resposta, de acordo com a expressão,

$$y = b_0 + b_1 C + b_{11} C^2 + b_2 GH + b_{22} GH^2 + b_{12} C \cdot GH \quad [\text{III.4}]$$

A análise estatística foi efectuada com o programa Statistica 6.0 (StatSoft 2001). A significância dos coeficientes do polinómio ( $b$ ) calculados foi aferida com o teste  $t$  de

*student*. A qualidade do ajuste do modelo foi avaliada examinando os resíduos. Por análise de variância (ANOVA), calcularam-se os valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), o erro residual, o erro puro (calculado a partir das repetições dos pontos) e a falta de ajuste. A significância da falta de ajuste indica se o modelo proposto descreve o verdadeiro comportamento das variáveis dependentes relativamente à concentração e ao grau de hidrólise. A soma dos quadrados (SQ) da falta de ajuste é calculada como  $SQ_{\text{residual}} - SQ_{\text{erro puro}}$ . A significância da falta de ajuste foi testada com o teste F,  $F = MQ_{\text{falta de ajuste}} / MQ_{\text{erro puro}}$ , sendo MQ a média da soma dos quadrados (SQ/graus de liberdade) (Neto *et al.* 1995; Van der Ven 2002).

Com o modelo construíram-se superfícies de resposta bidimensionais que, de uma forma gráfica, reflectem o efeito da variação das variáveis *C* e *GH* nos parâmetros em questão (Beebe *et al.* 1998; Van der Ven 2002).

#### 3.3.4.2 Aplicação do desenho experimental

Os parâmetros reológicos experimentais da gelificação são apresentados na tabela 3.2. A gelificação do HT09 a altas concentrações ( $> 13,5\%$ , experiências nº 7, 11, 12), ocorre ainda durante o aquecimento, ligeiramente, antes da cinética a  $80^\circ\text{C}$ . Como, no cálculo de  $t_g$ , se considerou  $t = 0$  no início da cinética a  $80^\circ\text{C}$ ,  $t_g$  é negativo para este hidrolisado nas experiências referidas.

Os coeficientes de regressão dos modelos quadráticos para as variáveis reais *C* e *GH* são apresentados na tabela 3.3. Os resultados estatísticos indicam que os modelos seleccionados explicam uma grande percentagem da variação total encontrada entre as amostras (valor de  $R^2$ ) e, portanto, são modelos credíveis. No caso do módulo elástico a  $20^\circ\text{C}$  ( $G'_{20}$ ), cerca de 99% da variação é explicada pelo modelo quadrático, enquanto que, no caso da variação relativa do módulo viscoso durante o arrefecimento ( $\Delta G''/G''_{80}$ ), o modelo explica apenas cerca de 85% da variação total. No entanto, a falta de ajuste é não significativa apenas para os modelos que descrevem o comportamento de  $G'$  a  $20^\circ\text{C}$  e de  $\gamma_c$ , indicando que, para os restantes parâmetros apresentados, existirão outros modelos, possivelmente, com interacções de ordem superior, com melhor desempenho que os modelos propostos (Massart *et al.* 1988).

A concentração limite de gelificação ( $C_0$ ), em função do grau de hidrólise, foi determinada empiricamente recorrendo ao modelo de  $G'_{20}$ . Para cada *GH*, calculou-se *C* para a qual  $G'$  é mínimo (a raiz da primeira derivada) e definiu-se essa concentração como  $C_0$ . Com os cinco pontos obtidos (um por cada grau de hidrólise), por regressão



linear, determinou-se a função  $3,84GH + 2,72 = C_0$ , para exprimir  $C_0$  em função de  $GH$ , ou  $GH_0 = 0,26C - 0,71$  para exprimir o  $GH$  limite ( $GH_0$ ) em função de  $C$  (figura 3.16). Devido aos erros inerentes aos modelos, a função exclui da zona de gelificação os ensaios 1, 15, 16 e 17 da tabela 3.2 nos quais  $G' > G''$  a 20 °C, no entanto todos estes materiais possuem  $\tan \delta > 0,28$  ou seja são géis muito incipientes. Mediante estas observações, pode-se inferir que as expressões apresentadas são estimativas razoáveis de  $C_0$  e  $GH_0$  em função de  $GH$  e  $C$ , respectivamente.

**Tabela 3.2** Parâmetros reológicos de gelificação. Resultados experimentais.

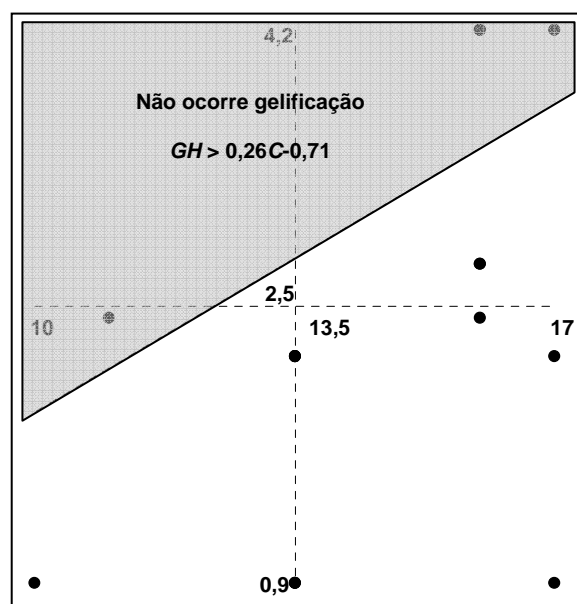
n°	$C$	$GH$	$c$	$gh$	$t_g$	$G'_{80}$	$G''_{80}$	$\frac{\Delta G'}{G'_{80}}$	$\frac{\Delta G''}{G''_{80}}$	$G'_{20}$	$G''_{20}$	$n'_{20}$	$\Delta n'$	$\gamma_c$
	%	%			(s)	(Pa)	(Pa)			(Pa)	(Pa)			
					a	b		c		d			E	f
1	11,0	2,5	-1,01	-0,06	2640	2,4	0,8	10,9	8,5	29,0	8,0	0,15	0,037	249,9
2	16,0	2,8	1,01	0,22	1440	67,2	10,6	6,8	8,1	598,5	102,0	0,11	0,003	79,2
3	16,0	2,8	1,01	0,22	1490	65,3	10,7	6,7	7,9	583,3	101,4	0,12	0,006	79,0
4	13,5	2,2	0,00	-0,26	2690	20,9	4,2	8,5	10,0	248,6	51,3	0,14	0,027	162,3
5	13,5	2,2	0,00	-0,26	2970	17,3	3,8	10,3	10,1	226,3	45,0	0,13	0,009	124,5
6	17,0	2,2	1,41	-0,26	493	528,0	41,4	4,2	9,1	2791,0	408,9	0,10	0,049	12,7
7	13,5	0,9	0,00	-1,41	-18	1582,0	108,0	2,9	7,5	6166,0	964,1	0,08	0,043	1,3
8	13,5	2,2	0,00	-0,26	2350	17,4	3,6	8,1	9,8	197,7	42,3	0,14	0,036	160,4
9	13,5	2,2	0,00	-0,26	3680	13,2	3,2	12,2	11,1	193,6	40,8	0,14	0,025	157,9
10	13,5	0,9	0,00	-1,41	2	1348,0	102,1	2,3	5,6	4790,0	668,3	0,09	0,045	1,02
11	13,5	0,9	0,00	-1,41	-12	1443,0	99,9	2,7	6,5	5026,0	859,0	0,08	0,042	1,01
12	17,0	0,9	1,41	-1,41	-108	4550,0	326,9	1,9	8,7	12070,0	2667,0	0,09	0,045	0,83
13	10,0	0,9	-1,41	-1,41	555	310,1	21,9	2,4	5,5	1067,0	136,6	0,08	0,038	25,0
14	16,0	2,5	1,01	-0,06	1190	267,0	27,0	2,9	5,0	1511,0	228,8	0,10	0,038	31,8
15	16,0	4,2	1,01	1,41	11900	0,4	0,3	-	-	8,7	7,0	0,44	0,298	125,3
16	16,0	4,2	1,01	1,41	-	0,3	0,3	28,4	19,4	10,0	7,6	0,42	0,271	125,2
17	17,0	4,2	1,41	1,41	8760	1,0	0,8	33,9	22,0	50,7	22,3	0,32	0,040	63,0

Os parâmetros foram obtidos a partir de: a) cinética a 80 °C; b) espectro mecânico a 80 °C; c) antes e após o arrefecimento de 80 para 20 °C; d) espectro mecânico a 20 °C; e) diferença entre o valor de  $n'$  da expressão  $G' \propto \omega^{n'}$  obtido durante os espectros mecânicos a 20 e a 80 °C; f) varrimento em deformação.

O valor do teste  $t$  para a estimativa dos efeitos apresentados na tabela 3.4 permite, em termos práticos, dimensionar os efeitos linear, quadrático e de interacção entre  $C$  e  $GH$  nas respostas analisadas (de Roubin *et al.* 1992). Como exemplo,  $\gamma_c$  é influenciado, significativamente, pelo efeito linear de  $GH$  no sentido positivo, pelo efeito linear de  $C$  no sentido negativo e pelo efeito da interacção entre  $C$  e  $GH$  no sentido negativo.

**Tabela 3.3** Coeficientes de regressão do modelo quadrático estimado; avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

	Coeficientes de regressão*						Qualidade do ajuste	
	$b_0$	$b_1$	$b_{11}$	$b_2$	$b_{22}$	$b_{12}$	Falta de ajuste	$R^2$
$t_g$	-13308,4	2091,8	-69,7	853,7	1457,3	-302,8	$p$ 0,0032	0,940
$G'80$	1900,8	-629,6	57,0	1883,1	584,8	-364,5	0,0002	0,979
$G''80$	139,4	-46,4	4,1	137,9	39,9	-25,7	0,0000	0,978
$\Delta G'/G'80$	-15,5	3,2	-0,1	-0,4	3,8	-0,6	0,0055	0,928
$\Delta G''/G''80$	-7,5	1,9	-0,04	0,40	2,1	-0,45	0,0007	0,848
$\Delta n'$	0,1304	-0,0009	0,0003	-0,1255	0,0521	-0,0042	0,0010	0,941
$n'20$	-0,273	0,053	-0,001	0,020	0,053	-0,012	0,0000	0,970
$G'20$	45,3	-571,3	104,9	2602,8	1459,1	-805,5	0,5872	0,991
$G''20$	1040,2	-379,1	33,9	1179,8	315,7	-209,7	0,0297	0,975
$\gamma_c$	-325,1	20,3	-0,2	410,1	-0,7	-22,8	0,0645	0,966



**Figura 3.16** Estimativa da zona de gelificação dentro do domínio experimental proposto

**Tabela 3.4** Valores do teste  $t$  aos efeitos lineares, quadráticos e de interacção entre C e GH estimados, nas respostas analisadas.

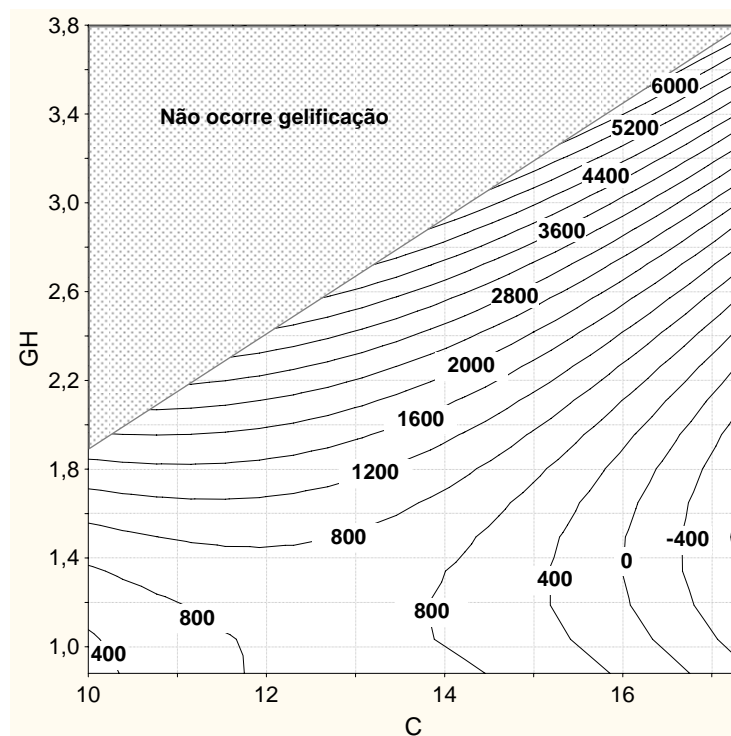
	teste $t^*$					
	$b_0$	$b_1$	$b_{11}$	$b_2$	$b_{22}$	$b_{12}$
$t_g$	18,5	-6,4	-3,0	20,6	13,5	-4,2
$G'80$	-5,7	-0,1	15,6	-4,2	37,5	-32,5
$G''80$	-8,5	1,8	31,6	-9,4	71,6	-64,0
$\Delta G'/G'80$	17,5	-4,3	-1,4	16,1	10,6	-2,5
$\Delta G''/G''80$	32,4	-2,5	-1,1	15,0	11,6	-3,6
$\Delta n'$	7,4	-2,0	0,4	16,7	20,2	-2,2
$n'20$	73,6	-15,8	-5,2	56	43,8	-13,7
$G'20$	-0,6	3,0	4,6	-5,6	15,0	-11,5
$G''20$	-1,6	0,8	7,3	-2,1	15,9	-14,7
$\gamma_c$	33,1	-16,8	-0,3	18,7	-0,2	-10,9

\*em *itálico* apresentam-se os valores de  $t$  sem efeito significativo ( $p < 0,05$ )

Os modelos quadráticos já definidos,  $f(C, GH)=t_g$ ,  $f(C, GH)=\Delta G'/G'80$ ,  $f(C, GH)=\Delta G''/G''80$ ,  $f(C, GH)=\Delta \tan \delta$ ,  $f(C, GH)=n'$  e  $f(C, GH)=\Delta n'$ , apesar da falta de ajuste ser significativa para o grau de significância exigido, serão abordados, oportunamente e com o devido cuidado, pois fornecem informações úteis acerca da natureza dos géis.

O gráfico com as linhas de iso-resposta para  $t_g$  é apresentado na figura 3.17. Repare-se que na tabela 3.4 é  $GH$  a variável com um efeito (linear e quadrático) mais significativo, sendo este facto observado graficamente na figura. Para  $GH > 1,6$  as linhas de iso-resposta acompanham, em certa medida, o eixo de  $C$ , sofrendo  $t_g$  um aumento significativo quando  $GH$  aumenta. Provavelmente, este efeito de  $GH$  em  $t_g$  está associado à estabilização da  $\beta$ -lactoglobulina pelos vários péptidos libertados durante a hidrólise, em particular, pelo péptido hidrofóbico de  $\sim 8,4$  kDa já referido (Huang *et al.* 1999).

$$t_g = -13308,4 + 2091,8C - 69,7C^2 + 853,7GH + 1457,3GH^2 - 302,8C \times GH \cap GH \leq 0,26C - 0,71$$

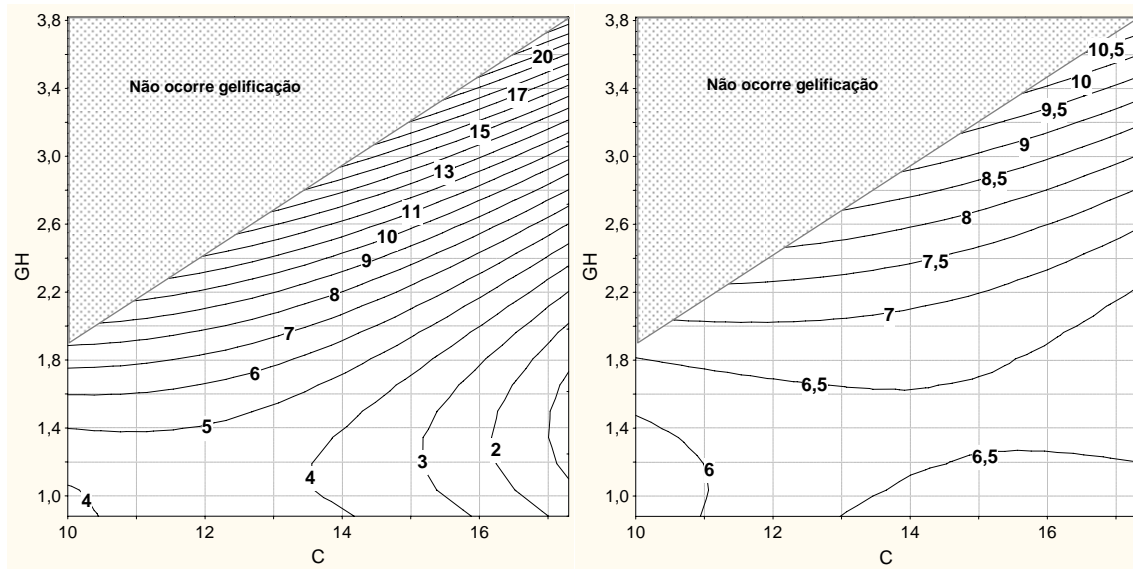


**Figura 3.17** Linhas de iso-resposta para os valores de  $t_g$  (s) durante obtidos durante a cinética a 80 °C

A figura 3.18 mostra as linhas de iso-resposta obtidas para  $\Delta G'/G'80$  e  $\Delta G''/G''80$  após o arrefecimento do gel de 80 para 20 °C. Foi observado, aquando do estudo da gelificação do CPS, que  $C$  não tem um efeito significativo nestes dois parâmetros, observação confirmada neste estudo (ver tabela 3.4). No entanto, é possível verificar que os efeitos (linear e quadrático) de  $GH$  são significativos e influenciam, positivamente, de forma similar, estes dois parâmetros. De realçar ainda que, tal como acontece com os géis de CPS, para  $GH$  baixos, o aumento relativo de  $G''$  é superior ao aumento relativo de  $G'$ . No entanto, para  $GH$  mais altos,  $G'$  tem um aumento relativo superior a  $G''$ .

$$\Delta G'/G'80 = -0,008 + 0,094C - 0,004C^2 + 0,199GH - 0,019GH^2 - 0,001C \cdot GH \quad \cap \quad GH \leq 0,26C - 0,71$$

$$\Delta G''/G''80 = 0,6552 + 0,0204C - 0,0004C^2 + 0,0672GH + 0,0059GH^2 - 0,0048C \cdot GH \quad \cap \quad GH \leq 0,26C - 0,71$$



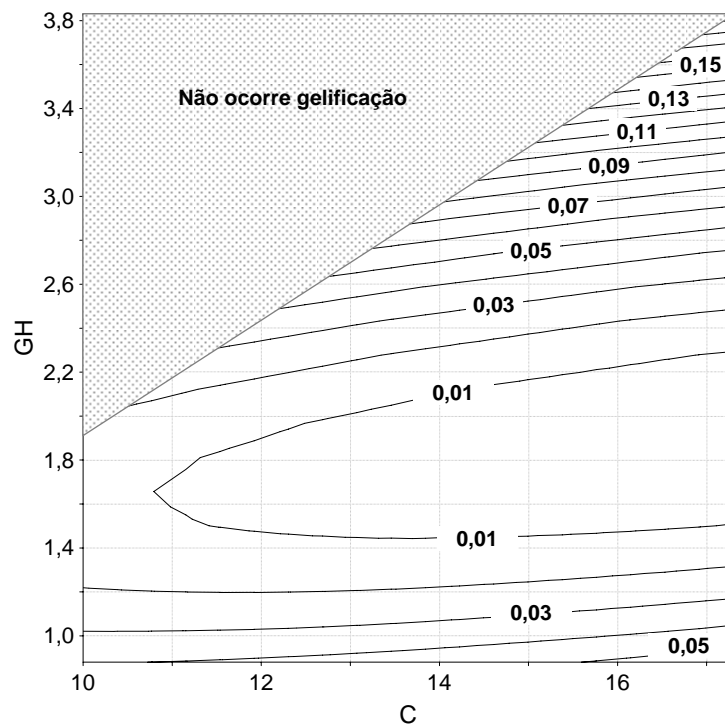
**Figura 3.18** Linhas de iso-resposta obtidas para: a)  $\Delta G'/G'80$  e b)  $\Delta G''/G''80$  durante o arrefecimento do gel de 80 a 20 °C

Foi anteriormente referido que o parâmetro  $n'$ , da relação  $G' \propto \omega^{n'}$ , obtido pela análise do espectro mecânico a 20 °C dos géis de CPS, aumenta relativamente ao mesmo parâmetro obtido a 80 °C. Ou seja, independentemente da concentração de proteína, o arrefecimento induz uma maior dependência de  $G'$  em função de  $\omega$  ( $\Delta n' \approx 0,03$ ). A observação da tabela 3.4 e da figura 3.19 revela que, mais uma vez, a concentração não tem efeito significativo em  $\Delta n'$ . No entanto, este parâmetro é significativamente influenciado de forma positiva pelo grau de hidrólise. Note-se que, tal como acontecia com os géis de CPS, ocorre um aumento de  $n'$  após o arrefecimento do gel; contudo, o

aumento é maior à medida que o grau de hidrólise aumenta. Estas observações revelam que, possivelmente, a diminuição da quantidade de  $\beta$ -lactoglobulina nativa e a libertação de péptidos durante a hidrólise alteram o balanço do tipo de forças que suportam a estrutura tridimensional do gel. O superior aumento de  $n'$ , à luz do que já foi discutido, indica o aumento da proporção das forças não covalentes, em especial, das pontes de hidrogénio, na manutenção da estrutura tridimensional do gel.

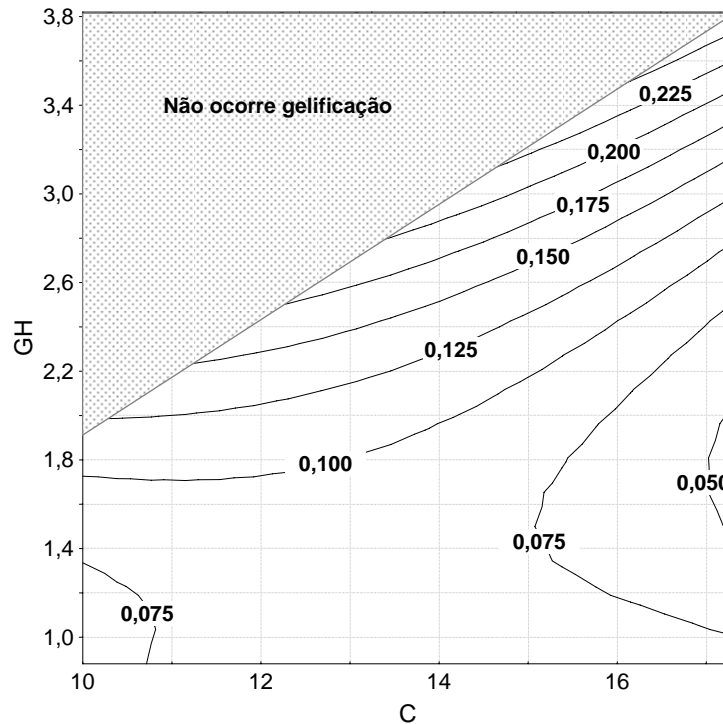
A figura 3.20 apresenta o perfil de iso-resposta do valor de  $n'$  obtido no estudo da relação  $G' \propto \omega^{n'}$ , do espectro mecânico obtido a 20 °C. A tabela 3.4 mostra que, tanto  $C$  como  $GH$ , têm um efeito significativo, embora contrário, neste parâmetro, sendo, tal como seria de esperar, muito maior a contribuição de  $GH$ . Verifica-se que o valor de  $n'$  é, para valores de  $GH$  baixos, muito semelhante àquele observado para os géis de CPS ( $n' \approx 0,08$ ) e aumenta significativamente quando  $GH > 2,0\%$ .

$$\Delta n' = 0,1304 - 0,0009C + 0,0003C^2 - 0,1255GH + 0,0521GH^2 - 0,0042C \times GH \quad \cap \quad GH \leq 0,26C - 0,71$$



**Figura 3.19** Linhas de iso-resposta obtidas para  $\Delta n'$  ( $n'$  obtido através da expressão  $G' \propto \omega^{n'}$ , resultado da análise dos espectros mecânicos a 20 e a 80 °C)

$$n' = -0,273 + 0,053C - 0,001C^2 + 0,020GH + 0,053GH^2 - 0,012C \times GH \cap GH \leq 0,26C - 0,71$$



**Figura 3.20** Linhas de iso-resposta obtidas para  $n'$  ( $n'$  obtido através da expressão  $G' \propto \omega^{n'}$ , resultado da análise do espectro mecânico a 20 °C)

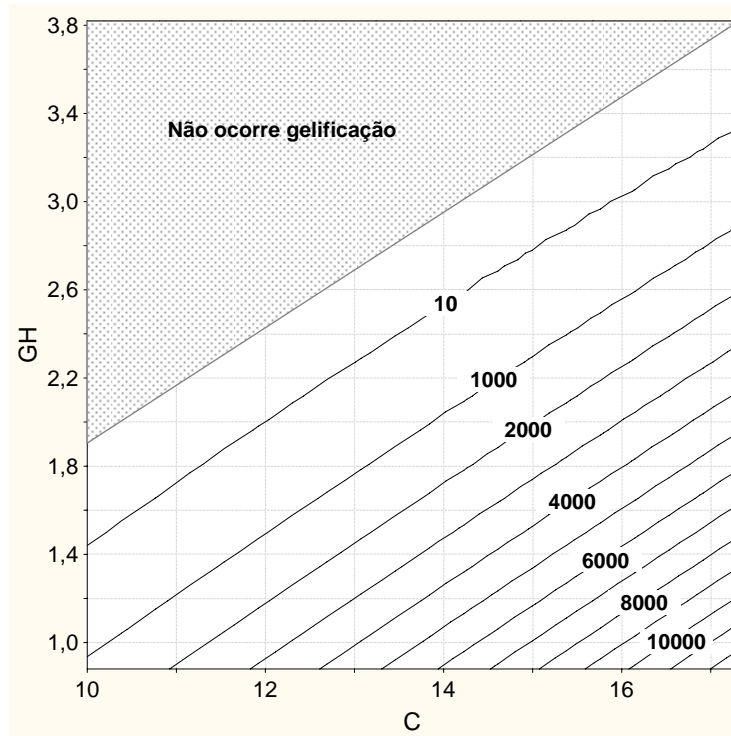
A figura 3.21 apresenta as linhas de iso-resposta para o  $G'$  medido durante o espectro mecânico efectuado a 20 °C a 6,283 rad.s<sup>-1</sup> como função de  $C$  e de  $GH$ . É claro o aumento do  $G'$  com o aumento de  $C$  e com a diminuição de  $GH$ . A análise dos efeitos de  $C$  e  $GH$  neste parâmetro recorrendo à tabela 3.4 deve ser feita com algum cuidado pois o termo mais significativo, o  $b_{22}$ , é positivo, o que não se verifica dentro da área definida pelo gráfico. Segundo o modelo aplicado, este parâmetro atinge um mínimo que foi utilizado para a determinação de  $C_0$  e  $GH_0$ . No entanto, devido à sua natureza quadrática, o modelo prevê um aumento de  $G'$  para  $GH$  superiores a  $GH_0$  ( $b_{22}$  negativo), o que é fisicamente incorrecto e obrigou à aplicação da uma restrição no modelo:  $GH < 0,26C - 0,71$ .

Otte *et al.* (2000) verificaram um aumento da dureza dos géis de  $\beta$ -lactoglobulina após hidrólise ligeira catalisada pela proteinase do *Bacillus licheniformis* (~ 88% de proteína intacta) e, atribuíram este facto à libertação de péptidos carregados que fazem diminuir a repulsão electrostática entre as moléculas de  $\beta$ -lactoglobulina e alterar o balanço entre as forças de atracção e de repulsão, favorecendo as interações proteína-proteína (Otte

*et al.* 2000). No entanto, para graus de hidrólise superiores, diminui de uma forma crítica a quantidade de proteína que, efectivamente, participa na formação do gel, sendo esta a principal razão apontada para a diminuição da força do gel.

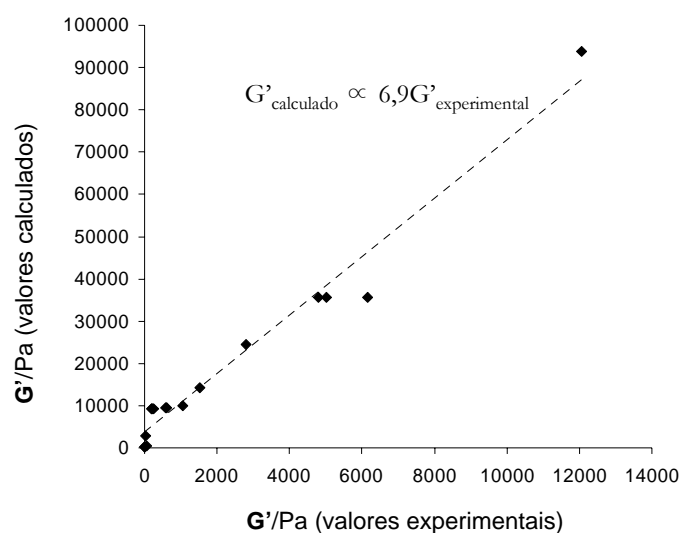
No trabalho aqui apresentado, para o menor grau de hidrólise testado (HT09) a quantidade de  $\beta$ -lactoglobulina não hidrolisada é  $\sim 85\%$  pois, de acordo com a figura 3.3 (página 50), ocorre uma perda de  $\sim 17\%$  de  $\beta$ -lactoglobulina por cada grau de hidrólise. Para além da especificidade da tripsina ser diferente, o que leva a uma mistura de péptidos diferente, a % de  $\beta$ -lactoglobulina nativa no hidrolisado é já mais baixa que a descrita por Otte *et al.* (2000) e, portanto, já não seria de esperar uma contribuição positiva de  $GH$  na dureza do gel. Neste estudo o  $GH$  tem aliás um efeito dramático na elasticidade do gel para o qual contribuem a diminuição da quantidade de proteína que participa na formação da estrutura do gel e, essencialmente, a estabilização da  $\beta$ -lactoglobulina pelos péptidos libertados durante a hidrólise (Huang *et al.* 1999; Otte *et al.* 2000).

$$G'_{20} = 45,3 - 571,3C + 104,9C^2 + 2602,8GH + 1459,1GH^2 - 805,5C \times GH \cap GH \leq 0,26C - 0,71$$



**Figura 3.21** Linhas de iso-resposta obtidas para  $G'/Pa$  a  $20\text{ }^{\circ}C$  ( $\omega = 6,283\text{ rad.s}^{-1}$ )

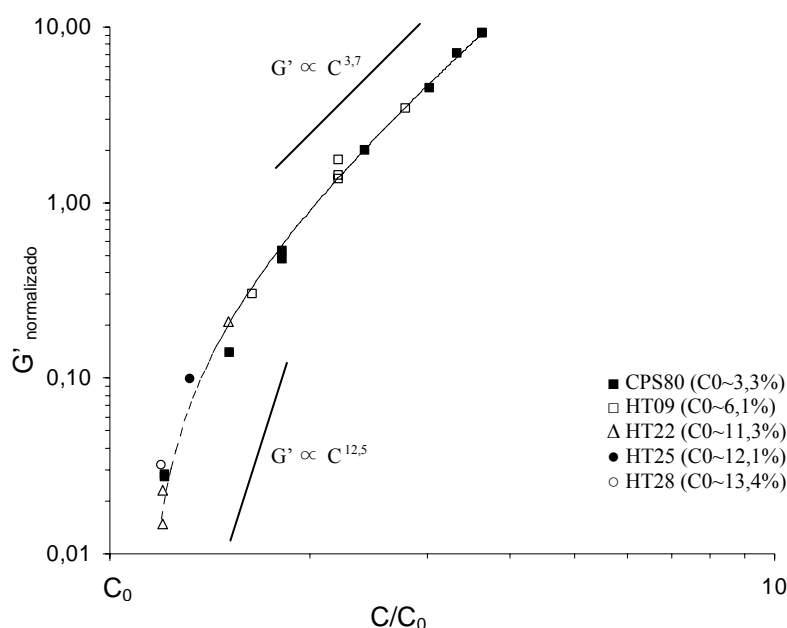
Na figura 3.22 são apresentados os valores de  $G'$  calculados recorrendo aos modelos da figura 3.11a, sendo  $C$  a concentração de  $\beta$ -lactoglobulina não hidrolisada presente em cada um dos géis proteicos. O cálculo de  $C$  foi feito considerando que, por cada unidade de grau de hidrólise, ocorre a perda de 17,3% de  $\beta$ -lactoglobulina (figura 3.3). Os valores de  $G'$  calculados são apresentados em função dos dados experimentais de  $G'$  (apresentados na tabela 3.2). Este exercício permite observar que os valores calculados são cerca de 6,9 vezes superiores aos experimentais o que indica que a capacidade de gelificação da  $\beta$ -lactoglobulina nativa está, em grande parte, comprometida. Tal como já foi discutido, este facto é, possivelmente, resultado da interacção entre os péptidos libertados durante a hidrólise e as moléculas de  $\beta$ -lactoglobulina, que, por associação, estabilizam a estrutura da proteína e/ou a impedem de estabelecer interacções, hidrofóbicas e/ou covalentes, efectivas para a criação da estrutura elástica tridimensional que caracteriza um gel. Estas observações permitem ainda concluir que, aos péptidos libertados durante a hidrólise catalisada pela tripsina, parece faltar capacidade de gelificação nas condições em que foi feito o estudo.



**Figura 3.22** Valores de  $G'$  calculados (ver texto), em função dos valores de  $G'$  experimentais apresentados na tabela 3.2



Na figura 3.23 são apresentados os valores normalizados de  $G'$  dos hidrolisados (excepto o HT42) e do CPS80, retirados do espectro mecânico a 20 °C quando  $\omega = 6,283 \text{ rad.s}^{-1}$ . Para a normalização de  $G'$  utilizou-se a expressão  $G'_{\text{normalizado}} = G'(C)/G'(xC_0)$ , com  $x = 2$ . Optou-se pelo factor 2 pois afasta o suficiente o valor de  $G'$  denominador de valores muito baixos e sujeitos a incerteza considerável. Para a normalização de  $C$  calculou-se  $C_0$  para os hidrolisados, processo que já foi descrito anteriormente.  $C_0$  do CPS80 foi calculado recorrendo aos respectivos dados de  $G'$  a 20 °C (figura 3.11a,  $G' \approx 0,0044C^{7,1}$  para  $C < 6\%$ ) considerando  $C_0$  quando  $G' \approx 30 \text{ Pa}$ . Esta “curva mestra” aponta para uma universalidade no comportamento de  $G'_{\text{normalizado}}$  em função de  $C/C_0$ . O expoente  $n$  da relação  $G' \propto C^n$  tende para  $\infty$ , à medida que  $C \rightarrow C_0$ , tal como já foi demonstrado por alguns autores para diversos polímeros gelificantes (Clark 1992; Kavanagh *et al.* 2000).

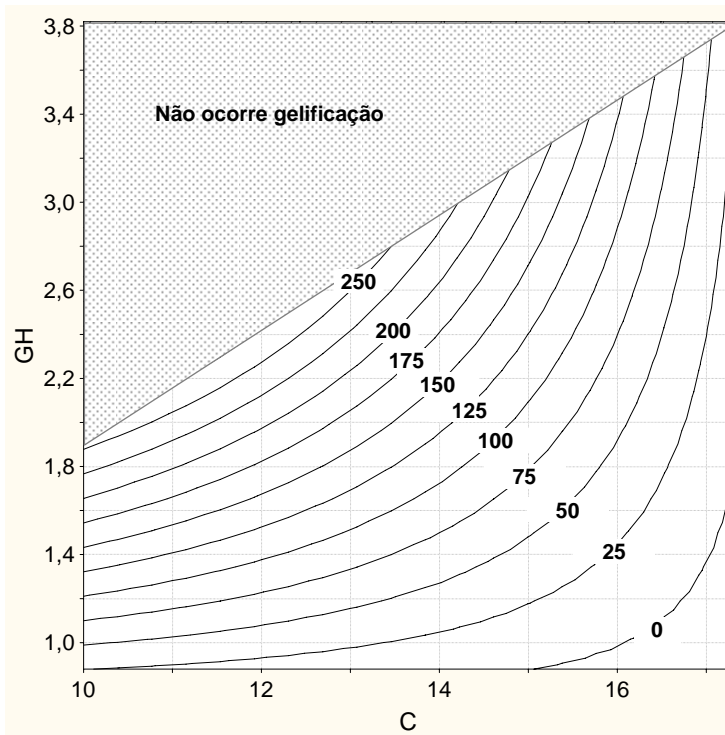


**Figura 3.23**  $G'_{\text{normalizado}}$  adimensional vs  $C/C_0$ . Foram acrescentados os declives, inicial e final, da “curva mestra” para uma melhor comparação

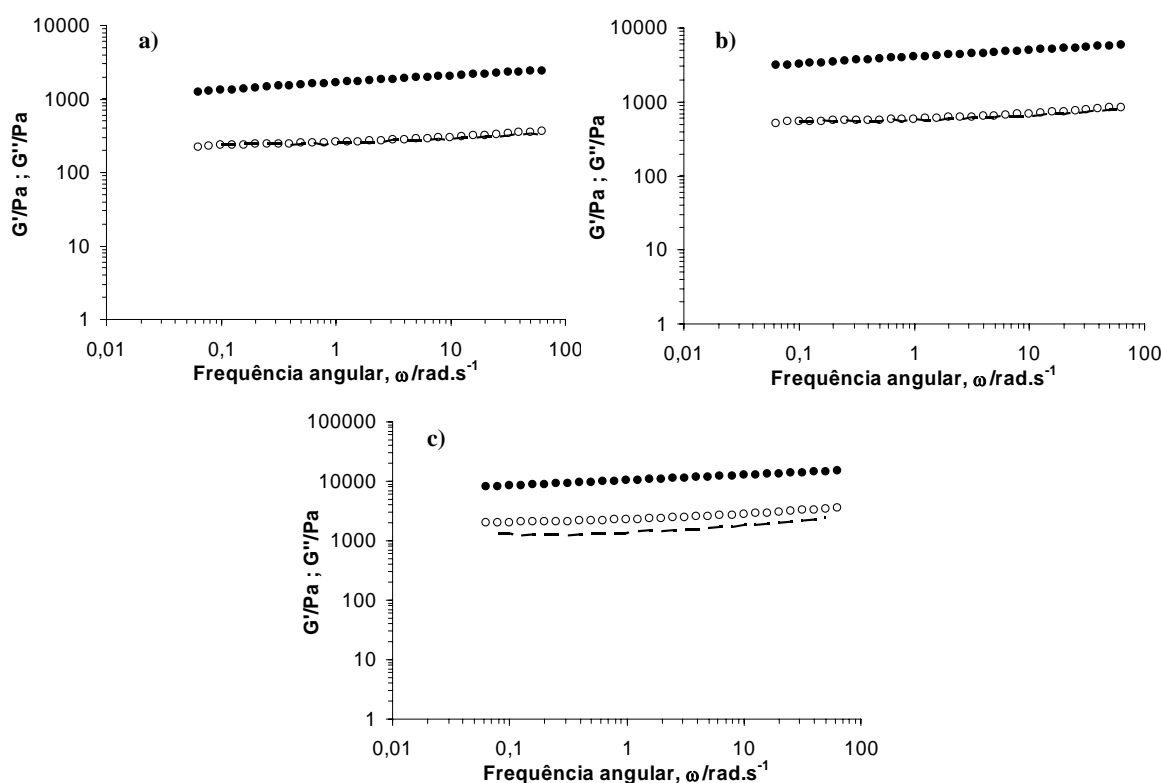
A figura 3.24 apresenta as linhas de iso-resposta para a deformação crítica dos géis ( $\gamma_c$ ) em função de  $C$  e  $GH$ . Os valores obtidos, com o teste  $t$ , para estimativa dos efeitos (tabela 3.3) revela, como já foi discutido, que os efeitos lineares de  $C$  e  $GH$  são os mais significativos e, apesar de equivalentes, afectam o parâmetro  $\gamma_c$  em sentidos opostos. O efeito da interacção entre  $C$  e  $GH$  tem também um efeito negativo bastante significativo.

O modelo quadrático, apresentado na figura 3.24, aponta para um valor de  $\gamma_c$  bastante próximo da deformação imposta durante os ensaios (1%) quando  $C$  se aproxima de 17% e  $GH$  se aproxima de 0,9%. Pode ser observado na tabela 3.2 que para o ensaio nº 12 foi determinado  $\gamma_c \sim 0,8\%$ , valor inferior à deformação imposta durante o ensaio reológico, ou seja, este ensaio foi feito ligeiramente fora da zona de viscoelasticidade linear. A observação da figura 3.25 na qual é apresentado o espectro mecânico a 20 °C de três dos géis analisados vem confirmar o referido. Nos géis dos ensaios 2 e 10, com  $\gamma_c \sim 79\%$  e 1,02%, respectivamente, o  $G''$  experimental sobrepõe-se ao  $G''$  calculado a partir de  $G'$ , de acordo com a expressão III.1. No entanto, no espectro mecânico do gel do ensaio 12, com  $\gamma_c \sim 0,83\%$ , o  $G''$  calculado é inferior ao experimental, sinal de que a deformação imposta neste ensaio afectou ligeiramente a estrutura do gel. Contudo, o ensaio não foi retirado do leque de experiências analisadas pois, para além do erro relativo ser pequeno, este ensaio contribui para a validação do método de determinação de  $\gamma_c$  e também para a validação do modelo apresentado na figura 3.24.

$$\gamma_c = -325,1 + 20,3C - 0,2C^2 + 410,1GH - 0,7GH^2 - 22,8C \times GH \cap GH \in (0,26C - 0,71)$$



**Figura 3.24** Linhas de iso-resposta obtidas para  $\gamma_c$  (%) durante o varrimento em deformação a 20 °C



**Figura 3.25** Espectros mecânicos efectuados aos géis a 20 °C. a) ensaio nº 2,  $\gamma_c \sim 79\%$ ; b) ensaio nº 10,  $\gamma_c \sim 1,02\%$ ; c) ensaio nº 12,  $\gamma_c \sim 0,83\%$ . ●  $G'$  experimental; ○  $G''$  experimental; —  $G''$  calculado de acordo com a equação III.1.

### 3.4 Algumas conclusões

O estudo da relação  $G' \propto C^n$  dos géis proteicos vem, independentemente do tipo de proteína ou péptidos, ao encontro da teoria proposta por Clark, já profusamente discutida, na qual o expoente  $n$  varia em função do regime de concentração estudado de tal forma que  $n \rightarrow \infty$  à medida que  $C \rightarrow C_0$ .

A hidrólise, quando  $GH > 0,9\%$ , reduz drasticamente a capacidade de gelificação das proteínas do soro devido à diminuição da quantidade de proteína que participa na formação da estrutura do gel e, principalmente, à estabilização da  $\beta$ -lactoglobulina (e outras proteínas minoritárias do soro) pelos péptidos libertados durante a hidrólise que, possivelmente, impedem a formação de pontes dissulfureto e interações hidrofóbicas efectivas na estabilização da estrutura tridimensional do gel.

A hidrólise altera o balanço de forças que suportam a estrutura tridimensional do gel, tudo indica que, aumentando a contribuição das pontes de hidrogénio e diminuindo a contribuição das pontes dissulfureto (ligações covalentes) e interações hidrofóbicas.

A modulação das propriedades de gelificação recorrendo à hidrólise enzimática, associado às vantagens nutricionais discutidas no capítulo 1, permite a aplicação destes ingredientes proteicos à base de soro de leite em alimentos líquidos ou semi-sólidos com alto teor em proteínas (bebidas funcionais com alto teor proteico, molhos para culinária, sobremesas lácteas funcionais etc.).

O planeamento experimental elaborado permite, dentro do que é exigido em termos práticos, uma boa descrição e previsão do comportamento de gelificação dos hidrolisados tripticos em função da concentração de proteínas e do grau de hidrólise.

### 3.5 Bibliografia

- Adler-Nissen J (1986) *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London, U.K.
- Aguilera JM (1995) Gelation of whey proteins. *Food Technology* 10:83-89
- AOAC (1975). In: Horwitz W (ed) *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Washington, USA, pp 15
- Barnes HA (2000) Linear viscoelasticity and time effects. In: Barnes HA (ed) *A Handbook of Elementary Rheology*. Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, University of Wales, Aberystwyth, pp 81-106
- Beebe KR, Pell RJ, Seasholtz MB (1998) Defining the problem. In: Beebe KR, Pell RJ, Seasholtz MB (eds) *Chemometrics: A Practical Guide*. Wiley-Interscience, USA, pp 9-25
- Clark AH (1992) Gels and Gelling. In: Schwartzberg HG, Hartel RW (eds) *Physical Chemistry of Foods*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 263-305
- de Roubin M-R, Cailas MD, Shen S-H, Groleau D (1992) Some factor influencing the proportion of periplasmatic hepatitis B virus pre-S2 antigen in the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*. *Journal of Industrial Microbiology* 9:69-72
- Doucet D, Gauthier SF, Foegeding EA (2001) Rheological characterization of a gel formed during extensive enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science* 66:711-715
- Eleya MMO, Ko S, Gunasekaran S (2004) Scaling and fractal analysis of viscoelastic properties of heat-induced protein gels. *Food Hydrocolloids* 18:315-323
- FCC (1981a) Food and Nutrition Board - National Research Council. Food Chemical Codex. National Academy Press, Washington, USA, pp 518
- FCC (1981b) Food and Nutrition Board - National Research Council. Food Chemical Codex. National Academy Press, Washington, USA, pp 466
- Gonçalves MP, Sittikijyothin W, da Silva MV, Lefebvre J (2004) A study of the effect of locust bean gum on the rheological behaviour and microstructure of a  $\beta$ -lactoglobulin gel at pH 7. *Rheologica Acta* no prelo
- Huang XL, Catignani GL, Swaisgood HE (1999) Modification of rheological properties of whey protein isolates by limited proteolysis. *Nahrung* 43:79-85
- Ikeda S, Foegeding EA, Hagiwara T (1999) Rheological study on the fractal nature of the protein gel structure. *Langmuir* 15:8584-8589
- Kavanagh GM, Clark AH, Ross-Murphy SB (2000) Heat-induced gelation of globular proteins: 4. Gelation kinetics of low pH  $\beta$ -lactoglobulin gels. *Langmuir* 16:9584-9594

- Lefèbvre T, Subirade M (2000) Molecular differences in the formation and structure of fine-stranded and particulate  $\beta$ -lactoglobulin gels. *Biopolymers* 54:578-586
- Massart DL, Vandeginste BGM, Deming SN, Michotte Y, Kaufman L (1988) Response surface and models. In: Massart DL, Vandeginste BGM, Deming SN, Michotte Y, Kaufman L (eds) *Chemometrics: a textbook*. Elsevier, Amsterdam, pp 255-269
- Mota MVT, Ferreira IMPLVO, Oliveira MBP, Rocha C, Teixeira JA, Torres D, Gonçalves MP (2004) Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrates: peptide HPLC profiles. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 27:2625-2639
- Neto BdB, Scarminio IS, Bruns RE (1995) Como construir modelos empíricos. In: Neto BdB, Scarminio IS, Bruns RE (eds) *Planejamento e otimização de experimentos*, Campinas, Brasil, pp 133-186
- Otte J, Lomholt SB, Ipsen RH, Qvist KB (2000) Effect of partial hydrolysis with an immobilized proteinase on thermal gelation properties of  $\beta$ -lactoglobulin B. *Journal of Dairy Research* 67:597-608
- Ross-Murphy SB (1991). Royal Society of Chemistry, London
- Shih W-H, Shih WY, Kim S-I, Liu J, Aksay IA (1990) Scalling behaviour of the elastic properties of colloidal gels. *Physical Review A* 42:4772-4779
- StatSoft (2001) STATISTICA for Windows. In: StatSoft I (ed). StatSoft, Inc, Tulsa, Oklahoma
- Tschoegl NW (1989) *The phenomenological theory of linear viscoelastic behavior. An introduction*. Springer, Berlin
- Van der Ven C (2002) Biochemical and functional characterisation of casein and whey protein hydrolysates. Wageningen Universiteit, Wageningen, pp 170
- Verheul M, Roefs SPFM (1998a) Structure of particulate whey protein gels: effect of NaCl concentration, pH, heating temperature, and protein composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:4909-4916
- Verheul M, Roefs SPFM (1998b) Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocolloids* 12:17-24
- Wu H, Morbidelli M (2001) A model relating structure of colloidal gels to their elastic properties. *Langmuir* 17:1030-1036



# **CAPÍTULO 4**

## **Estudo da gelificação de sistemas mistos**

### **Efeito da concentração de polissacarídeos**

#### **4.1 Materiais**

Durante o procedimento experimental usou-se um concentrado comercial de proteínas de soro de leite e, para a sua hidrólise enzimática, um preparado de tripsina de pâncreas suíno, já descritos na secção 3.1. A goma de tara (GT, referência 1760) foi gentilmente fornecida pela Carob S.A. (Espanha).

#### **4.2 Métodos experimentais**

##### **4.2.1 Caracterização das amostras**

O teor em humidade, o resíduo seco e o teor em cinzas foram determinados de acordo com o descrito no capítulo 3 (secções 3.2.2.1 e 3.2.2.2, respectivamente). O teor em proteínas da goma de tara foi determinado após quantificação do azoto total, de acordo

com o descrito na secção 3.2.2.3, e multiplicado o resultado pelo factor de conversão 6,25.

#### 4.2.1.1 Determinação da razão manose/galactose da goma de tara

A determinação da razão manose/galactose (M/G) foi efectuada recorrendo à cromatografia gasosa, após hidrólise dos galactomananos em meio ácido e conversão dos monossacarídeos livres em acetatos de alditol, de acordo com o método proposto por Coimbra (Coimbra *et al.* 1996).

#### 4.2.1.2 Determinação da viscosidade intrínseca da goma de tara

A viscosidade de soluções diluídas foi determinada usando um viscosímetro capilar Cannon Fenske (ASTM-D2515, ISO 3105, Séries 100) colocado verticalmente num banho termostaticado a  $25 \pm 0,1$  °C. As soluções diluídas testadas tinham viscosidades relativas entre 1,2 e 2,0 de modo a assegurar boa exactidão e linearidade na extrapolação para concentração zero (Sittikijyothin *et al.* 2005).

A viscosidade intrínseca,  $[\eta]$ , foi obtida por dupla extrapolação para concentração zero das equações de Huggins' e de Kraemer, respectivamente:

$$[\eta]_{red} = [\eta] + k'[\eta]^2 C \quad [IV.1]$$

$$\frac{(\ln \eta_{rel})}{C} = [\eta] + k''[\eta]^2 C \quad [IV.2]$$

Onde  $[\eta]_{red}$  e  $[\eta]_{rel}$  são, respectivamente, as viscosidades reduzida e relativa;  $k'$  e  $k''$  são, respectivamente, os coeficientes de Huggins' e de Kraemer;  $C$  é a concentração da solução.

#### 4.2.1.3 Determinação da massa molecular média viscosimétrica

A massa molecular média viscosimétrica,  $\overline{M}_v$ , foi calculada segundo a relação de Mark-Houwink dada por Doublier e Launay para a goma de guar e modificada por Gaisford *et al.* tendo em consideração as diferentes razões M/G dos galactomananos de diferentes origens (Doublier e Launay 1981; Gaisford *et al.* 1986):



$$[\eta] = 11,55 \times 10^{-6} [(1 - \alpha) \overline{M}_v]^{0,98} \quad [\text{IV.3}]$$

onde  $\alpha = 1/[(M/G) + 1]$  e  $[\eta]$  é expressa em dL/g.

## 4.2.2 Estudo da gelificação

### 4.2.2.1 Preparação das soluções de goma de tara

A goma de tara foi lentamente adicionada a água destilada (ou tampão fosfato, pH 7,0; quando se destinava a misturas com proteínas) sob forte agitação. A dispersão foi mantida sob agitação moderada durante 1 hora à temperatura ambiente. De seguida, a dispersão foi aquecida a 85-90 °C sob agitação moderada durante 30 minutos. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 43500 g durante 1 hora. Para calcular a concentração final da solução foi determinado o resíduo seco (de acordo com o ponto 3.2.1.1).

### 4.2.2.2 Preparação das misturas de proteínas de soro/goma de tara

Foram preparadas três tipos de misturas proteína-goma de tara. Uma mistura foi preparada com concentrado proteico; as outras duas foram preparadas com dois hidrolisados enzimáticos de tripsina com graus de hidrólise 0,9 e 4,2, respectivamente. Estes preparados proteicos foram adicionados a soluções de goma de tara de forma a obter as misturas apresentadas na tabela 4.1. A força iónica foi ajustada a 220 mM com NaCl. As misturas foram, depois, agitadas suavemente durante 3 horas à temperatura ambiente. O pH das misturas, medido antes do ensaio, foi de  $7,1 \pm 0,3$ .

**Tabela 4.1** Composição das misturas estudadas

Mistura	GH	Proteína	Polissacarídeo
		(%)	
CPS/0	0,0	5,0	0,0
CPS/2	0,0	5,0	0,2
CPS/5	0,0	5,0	0,5
CPS/8	0,0	5,0	0,8
HT09/0	0,9	9,0	0,0
HT09/2	0,9	9,0	0,2
HT09/5	0,9	9,0	0,5
HT09/8	0,9	9,0	0,8
HT42/0	4,2	17,0	0,0
HT42/2	4,2	17,0	0,2
HT42/5	4,2	17,0	0,5
HT42/8	4,2	17,0	0,8

A concentração de proteína nas misturas preparadas é diferente para cada um dos três ingredientes estudados. Observou-se, no capítulo 3, que o hidrolisado HT42 gelifica tenuemente quando a concentração de material proteico é inferior a 17%. Seria muito difícil, experimentalmente, obter concentrações desta ordem com o CPS e o HT09, devido à sua relativa baixa solubilidade. Optou-se então por concentrações de proteínas e/ou péptidos diferentes, de forma a obter géis com valores de  $G'$  dentro da mesma ordem de grandeza.

#### *4.2.2.3 Ensaios reológicos*

Os ensaios reológicos foram efectuados de acordo com o descrito no capítulo 3 (secção 3.2.3.2).

Os valores apresentados referem-se à média de dois ensaios. Definiu-se o limite de confiança com uma probabilidade de 95%, como a média  $\pm 1,96 \times \text{desvio padrão} / \sqrt{n}$  ( $n$  é o numero de repetições; neste ensaio  $n = 2$ ).

#### *4.2.2.4 Microscopia*

Adicionou-se 0,02, 0,03 e 0,05 mL de solução de rodamina isotiocianato (RITC 0,2%) às misturas de CPS, HT09 e HT42, respectivamente, de forma a manter aproximada a razão RTIC/proteína. As misturas foram agitadas durante 1 hora e depois colocadas numa lâmina côncava. Foram cuidadosamente cobertas com uma lamela e seladas com um verniz de forma a permitir a sua submersão num banho termostatzado. Após alguns minutos, necessários para a secagem do verniz (aproximadamente 10 min), as lâminas foram colocadas no banho a 20 °C. Imediatamente a seguir, as amostras foram aquecidas de 20 °C a 80 °C durante 30 minutos (2 °C/min) e, a essa temperatura, foram mantidas durante 3,5 horas. As amostras foram, posteriormente, arrefecidas de 80 °C a 20 °C durante 30 minutos (2 °C/min) e equilibradas durante 1 hora a 20 °C.

As lâminas foram retiradas do banho e observadas recorrendo, inicialmente, a um estéreo-microscópio óptico ligado a uma vídeo-câmara digital (Sony Exwave Had, Tokyo, Japan). Posteriormente, as lâminas foram observadas num microscópio confocal de varrimento laser (Leica, TCS SP2 AOBS) equipado com um laser de hélio-neon. O comprimento de onda de excitação foi de 543 nm e a emissão foi monitorizada entre 553 e 678 nm. O compasso de aquisição da imagem, no eixo dos  $zz$ , foi de 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2.5 Sinérese

Cerca de 1 mL de cada uma das 12 misturas foi introduzido num Eppendorf® de 2 mL, selado, e colocado num banho a 20 °C. Imediatamente a seguir, cada suspensão foi aquecida de 20 a 80 °C durante 30 minutos (2 °C/min) e, a essa temperatura, foi mantida durante 3,5 horas. A amostra foi, posteriormente, arrefecida de 80 a 20 °C durante 30 minutos (2 °C/min) e equilibrada durante 12 horas a 20 °C. Depois desse processo de gelificação térmica as amostras foram retiradas do banho. Cada Eppendorf® foi pesado. A água que foi excluída da matriz durante o processo de gelificação foi escorrida e a superfície do gel enxugada com papel absorvente. A sinérese foi determinada pela diferença de peso de acordo com a expressão:  $[(\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial}] * 100$ .

Os valores apresentados referem-se à média de cinco ensaios. Definiu-se o limite de confiança com uma probabilidade de 95% como a média  $\pm 1,96 * \text{desvio padrão} / \sqrt{n}$  (n é o numero de repetições; neste ensaio n = 5)

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Caracterização das amostras

Os ingredientes proteicos foram anteriormente caracterizados (tabela 3.1). Na tabela 4.1 apresentam-se os resultados da caracterização físico-química da goma de tara bruta utilizada no estudo. O comportamento reológico da goma de tara usada neste ensaio foi recentemente descrito e modelado (Sittikijyothin *et al.* 2005).

Tabela 4.1 Caracterização físico-química da goma de tara.

Humidade		%	11,2	±	0,01
Cinzas		%	0,77	±	0,02
Proteína		%	3,5		
Manose		mg/g	611,9	±	26,9
Galactose		mg/g	204,1	±	16,7
Razão manose/galactose	M/G		2,95	±	0,04
Viscosidade intrínseca*	$[\eta]$	dL/g	14,96		
Coefficiente de Huggins	$k'$		0,79		
Coefficiente de Kraemer	$k''$		0,09		
Massa molecular média viscosimétrica	$\overline{M}_v$	$\cdot 10^6$	2.31	±	0,03

\* calculada como a média da dupla extrapolação para concentração zero utilizando as equações de Huggins' e de Kraemer

### 4.3.2 Ensaios reológicos

A análise dos resultados obtidos durante a rampa de aquecimento de 25 °C a 80 °C e na cinética de gelificação a 80 °C deve, no caso de misturas proteína/polissacarídeo, ser feita com alguma cautela pois ocorre uma competição entre o decréscimo dos módulos com o aumento da temperatura, devido à contribuição do polissacarídeo, e um aumento dos módulos devido à gelificação da proteína. Portanto, o ponto de gelificação, definido normalmente, como o instante em que  $G'=G''$ , pode levar a interpretações erróneas acerca dos efeitos do polissacarídeo na desnaturação, agregação e gelificação da proteína.

O estudo comparativo, feito na etapa da cinética de gelificação a 80 °C, baseou-se na evolução da derivada  $dG'/dt$  vs *tempo* como indicação da taxa de gelificação.

A figura 4.1 exemplifica o tratamento efectuado. Dividiu-se, a curva em quatro fases: uma inicial fase de subida rápida da taxa de gelificação (*fase a*), uma fase de descida rápida da taxa (*fase b*), uma fase intermédia onde a taxa continua a descer mais lentamente (*fase c*) e, finalmente, um fase onde  $dG'/dt$  atinge um valor próximo do constante (Gonçalves *et al.* 2004a).

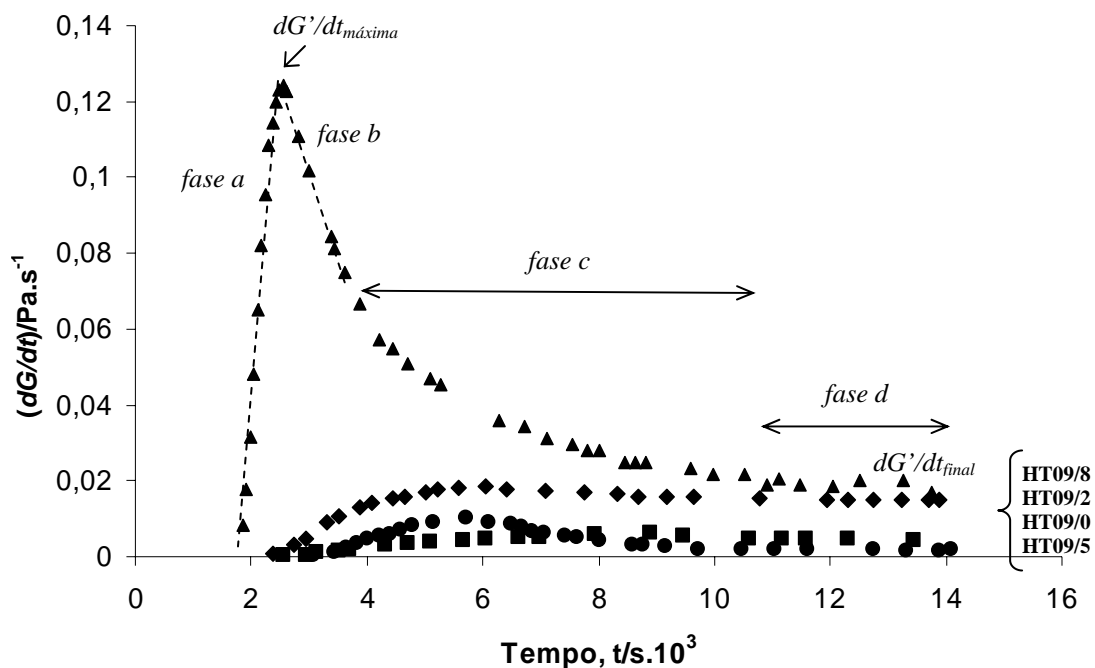
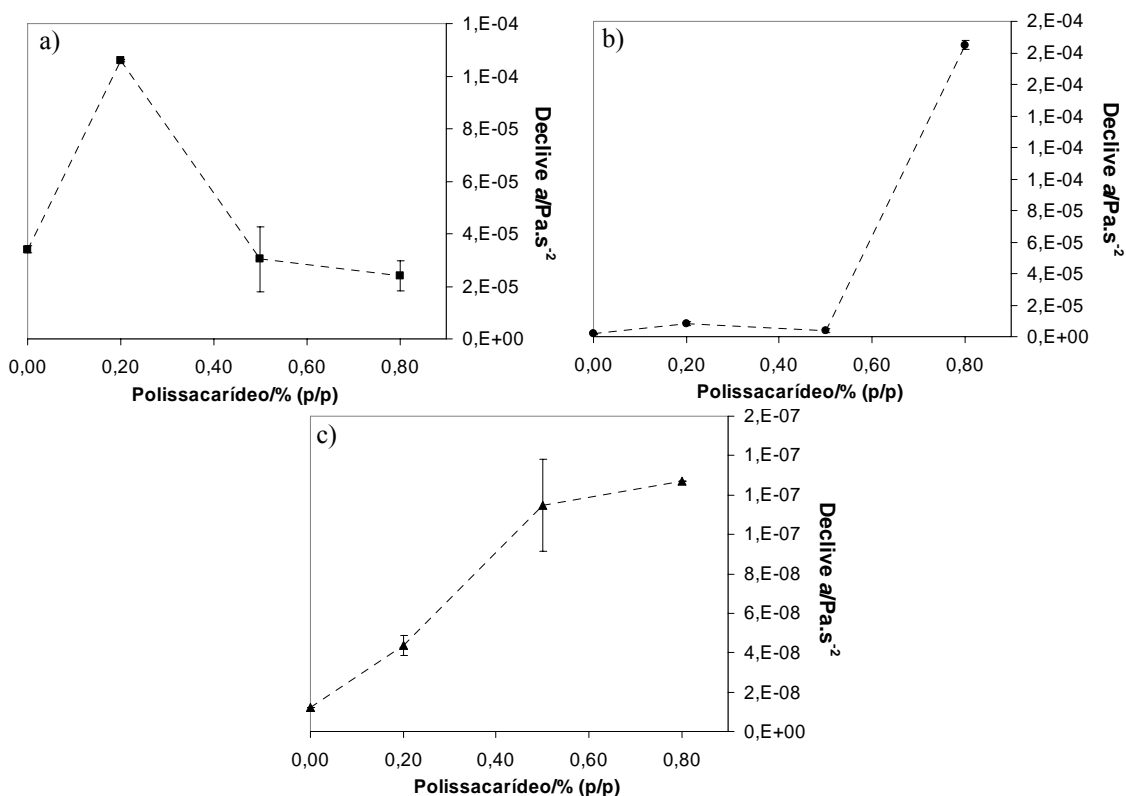


Figura 4.1 Comportamento da taxa de crescimento do  $G'$  a 80°C

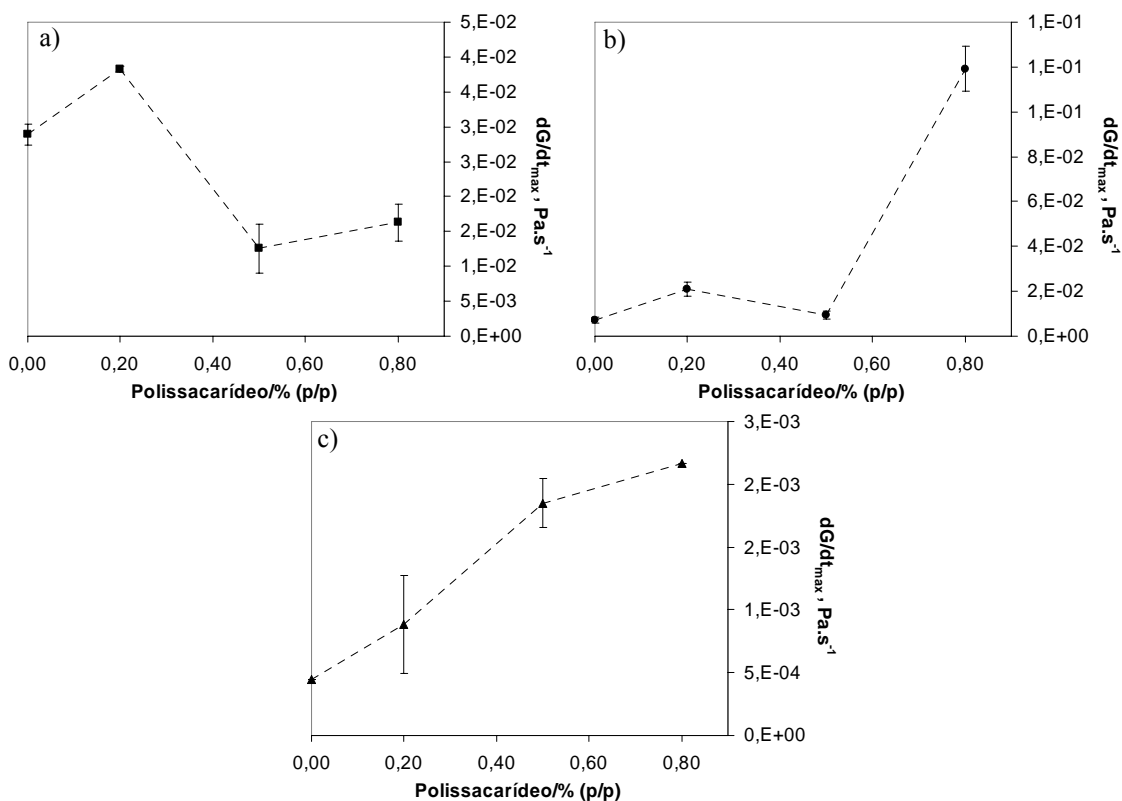
Para cada mistura, foram calculados alguns parâmetros a partir da curva apresentada na figura 4.1. O declive da derivada  $dG'/dt$  da *fase a* ( $\text{Pa.s}^{-2}$ ) é uma medida da “aceleração” da gelificação. O efeito do polissacarídeo neste parâmetro é ilustrado na figura 4.2. Para cada um dos sistemas, o polissacarídeo altera o parâmetro que denominamos aceleração da gelificação. O efeito é diferente quando comparamos os sistemas; no entanto, podemos observar que pequenas concentrações de polissacarídeo (0,2%) aceleram o processo de gelificação em todos os sistemas.

Quando aumentamos a concentração para 0,5% verifica-se uma diminuição da aceleração da gelificação para os sistemas de CPS e HT09, que continua a baixar nos sistemas CPS quando a concentração de polissacarídeo aumenta para 0,8% mas que, para o sistema HT09, tem um aumento muito significativo. No sistema HT42, o aumento da aceleração da gelificação é proporcional à adição de polissacarídeo.



**Figura 4.2** Efeito da goma de tara no declive da *fase a*. Média  $\pm$  Intervalo Confiança 95%.  
 $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\omega = 1\text{ Hz}$  e  $\gamma = 1\text{ \%}$ . a) CPS; b) HT09; c) HT42

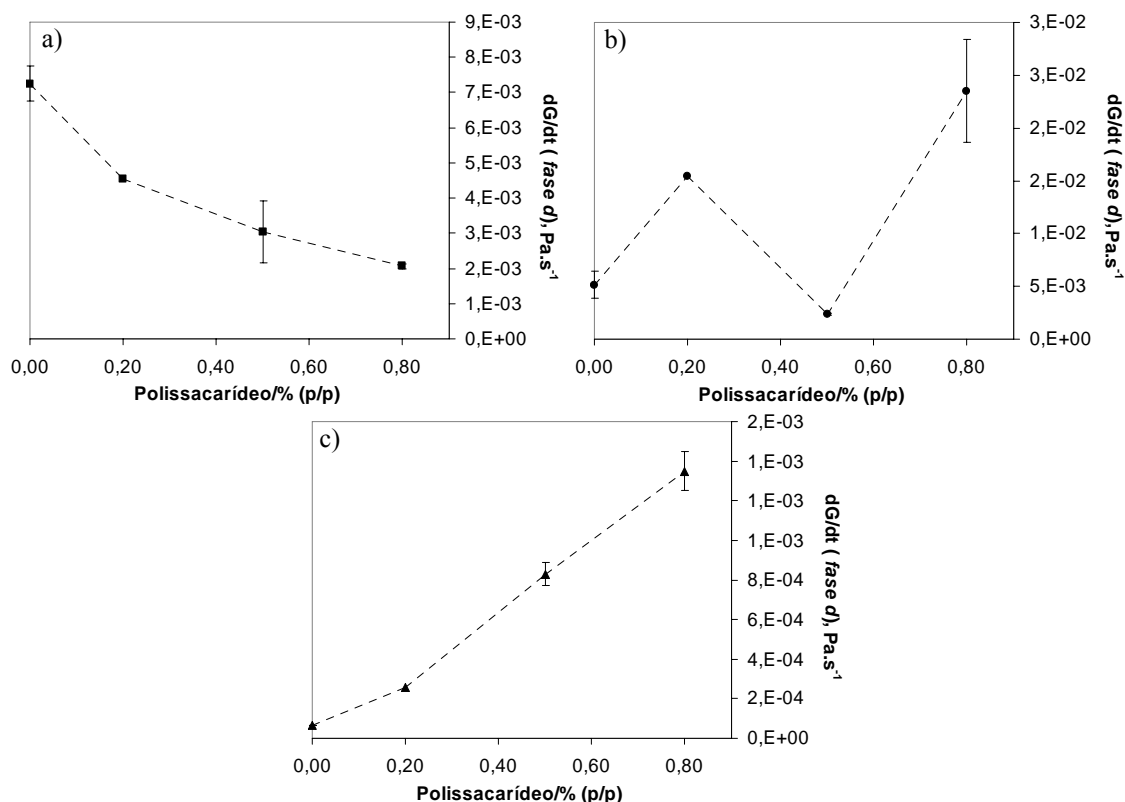
A figura 4.3 apresenta o efeito do polissacarídeo no comportamento da taxa de gelificação máxima dos sistemas ( $dG'/dt_{max}$ ,  $\text{Pa.s}^{-1}$ ) que, como seria de esperar, é semelhante àquele observado para o parâmetro da figura 4.2.



**Figura 4.3** Efeito do polissacarídeo na taxa de gelificação máxima atingida ao longo da cinética. Média  $\pm$  Intervalo Confiança 95%.  $T = 80^\circ\text{C}$ ;  $\omega = 1\text{ Hz}$  e  $\gamma = 1\%$ . a) CPS; b) HT09; c) HT42

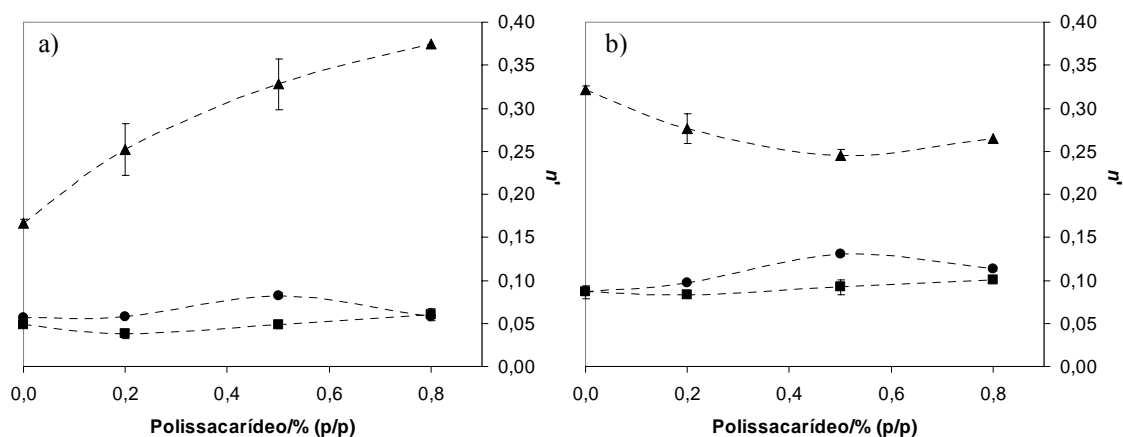
Após o estabelecimento da ténue rede tridimensional no momento da gelificação, as moléculas aí presentes na fase *sol* vão-se agregando, reforçando a rede, o que faz aumentar a sua elasticidade (processo de cura). A taxa de gelificação, por seu lado, diminui até atingir um valor baixo, muito inferior à taxa de gelificação máxima (*fase d*). No entanto, nas misturas HT09/0, HT09/02 e HT42/08, apesar de  $dG'/dt_{final}$  bastante baixo,  $dG'/dt_{final} \approx 0,7 dG'/dt_{máxima}$ , o que, aparentemente, indica que, nestas amostras o processo de gelificação se encontrava, ainda, na *fase c* da cinética de gelificação.

Na figura 4.4, observa-se o valor de  $dG'/dt$  atingido no final das 3:30 h, a  $80^\circ\text{C}$  (*fase d*). Este parâmetro diminui no caso das misturas CPS e aumenta no caso das misturas HT42, à medida que a concentração de polissacarídeo vai aumentando. Nas misturas de HT09, o comportamento deste parâmetro é semelhante ao referido para as misturas de HT42, embora diminua quando a concentração de polissacarídeo ronda os 0,5%.



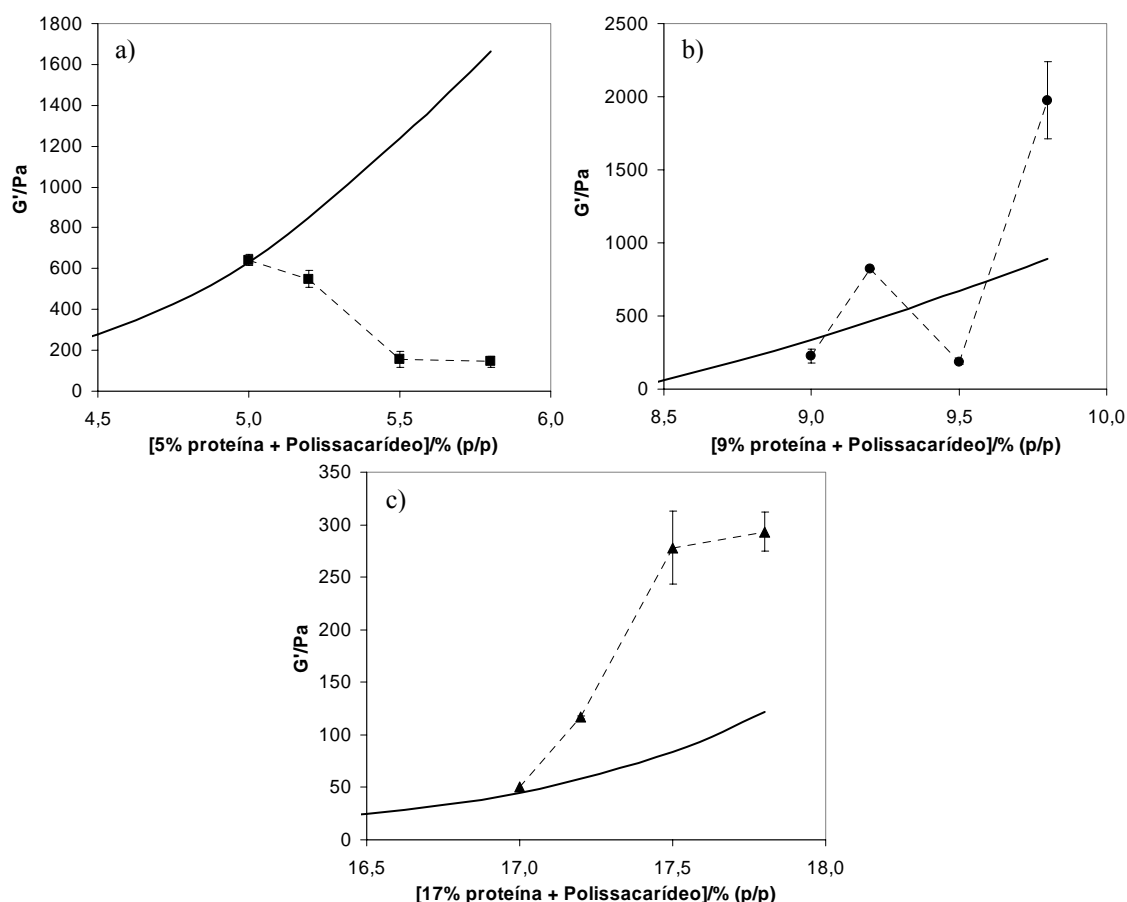
**Figura 4.4** Efeito da goma de tara na taxa de gelificação atingida no fim da cinética. Média  $\pm$  Intervalo Confiança 95%.  $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\omega = 1\text{ Hz}$  e  $\gamma = 1\text{ \%}$ . a) CPS; b) HT09; c) HT42

Apesar dos géis estarem ainda em evolução, esta tornou-se suficientemente lenta para, com alguma confiança, medir um espectro mecânico a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após o arrefecimento e a cinética a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mediu-se outro espectro mecânico. Os valores de  $n'$ , da relação  $G' \propto \omega^{n'}$ , obtidos através da análise do espectro mecânico a  $80$  e a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , já discutidos no capítulo 3, não são significativamente influenciados pela presença de polissacarídeo excepto no caso dos géis do hidrolisado HT42, principalmente, a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (figura 4.5).



**Figura 4.5**  $n'$  retirado da expressão  $G' \propto \omega^{n'}$  obtida durante o espectro mecânico dos géis. Média  $\pm$  Intervalo Confiança 95%.  $\gamma = 1\text{ \%}$ . a)  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; b)  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . CPS ■, HT09 ●, HT42 ▲

O valor de  $G'(\omega = 1 \text{ Hz})$ , em função da concentração de polissacarídeo, é apresentado na figura 4.6. Todos os géis estudados possuem valores de  $G'$  na mesma ordem de grandeza ( $100 < G' < 1000 \text{ Pa}$ ), excepto o HT09/8 com  $G' \sim 2000 \text{ Pa}$  e HT42/2 com  $G' \sim 50 \text{ Pa}$ . De realçar que, mais uma vez, a presença de goma leva a uma alteração das propriedades mecânicas dos géis. Estas alterações são diferentes quando os três preparados proteicos são comparados entre si.



**Figura 4.6** Módulo elástico ( $G'$ ) em função da concentração de polissacarídeo (medido durante o espectro mecânico,  $\omega = 1 \text{ Hz}$ ). Média  $\pm$  Intervalo Confiança 95%.  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\gamma = 1 \text{ \%}$ . a) CPS; b) HT09; c) HT42. — Géis de proteína; ---- Géis de proteína + polissacarídeo.

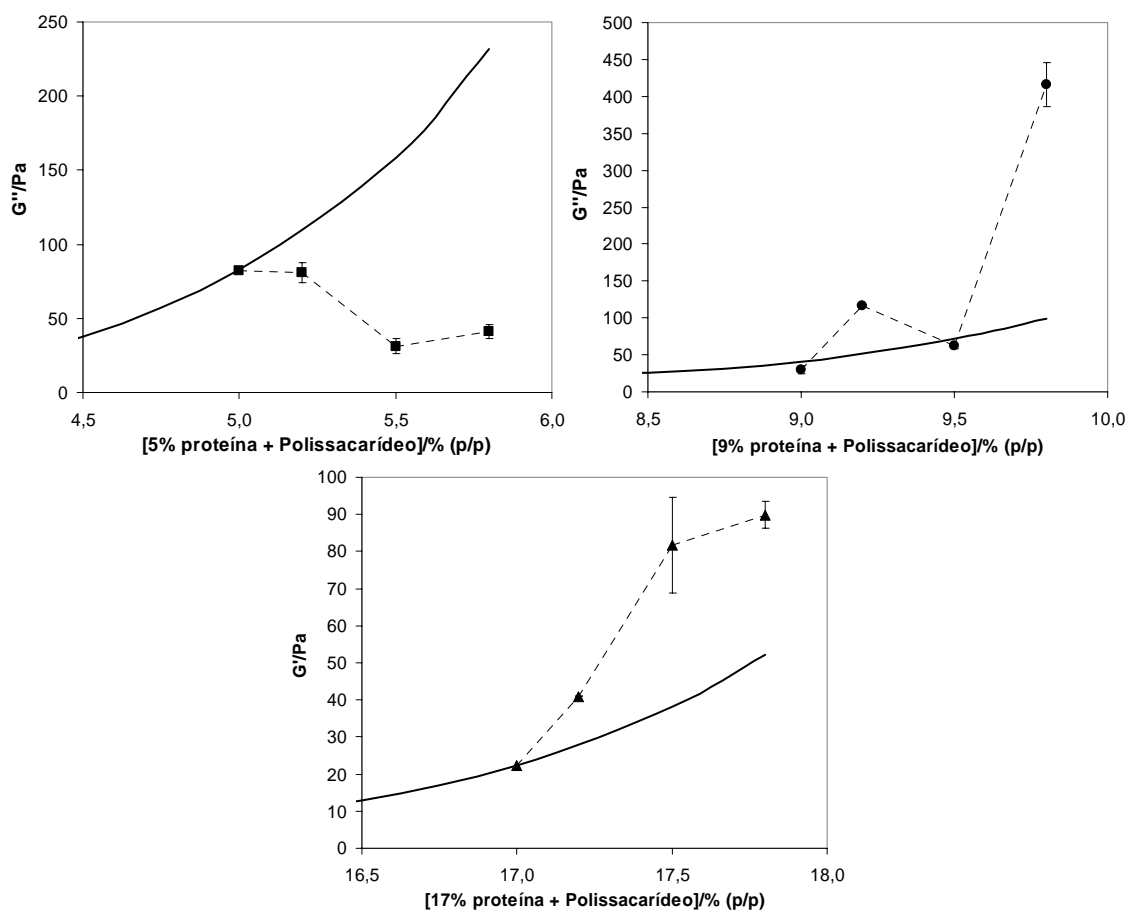
A presença de polissacarídeo durante a gelificação e maturação do gel de CPS leva a uma diminuição significativa do módulo elástico em função da concentração, principalmente, quando a concentração sobe de 0,2 para 0,5%. Observa-se um comportamento inverso ao anteriormente descrito nos géis de HT42, onde o polissacarídeo contribui significativamente para o aumento do módulo elástico. Nos



géis de HT09, o polissacarídeo tem, também, um efeito sinérgico relativamente ao módulo elástico dos géis; observa-se, no entanto, um mínimo quando a concentração de polissacarídeo é próxima de 0,5%.

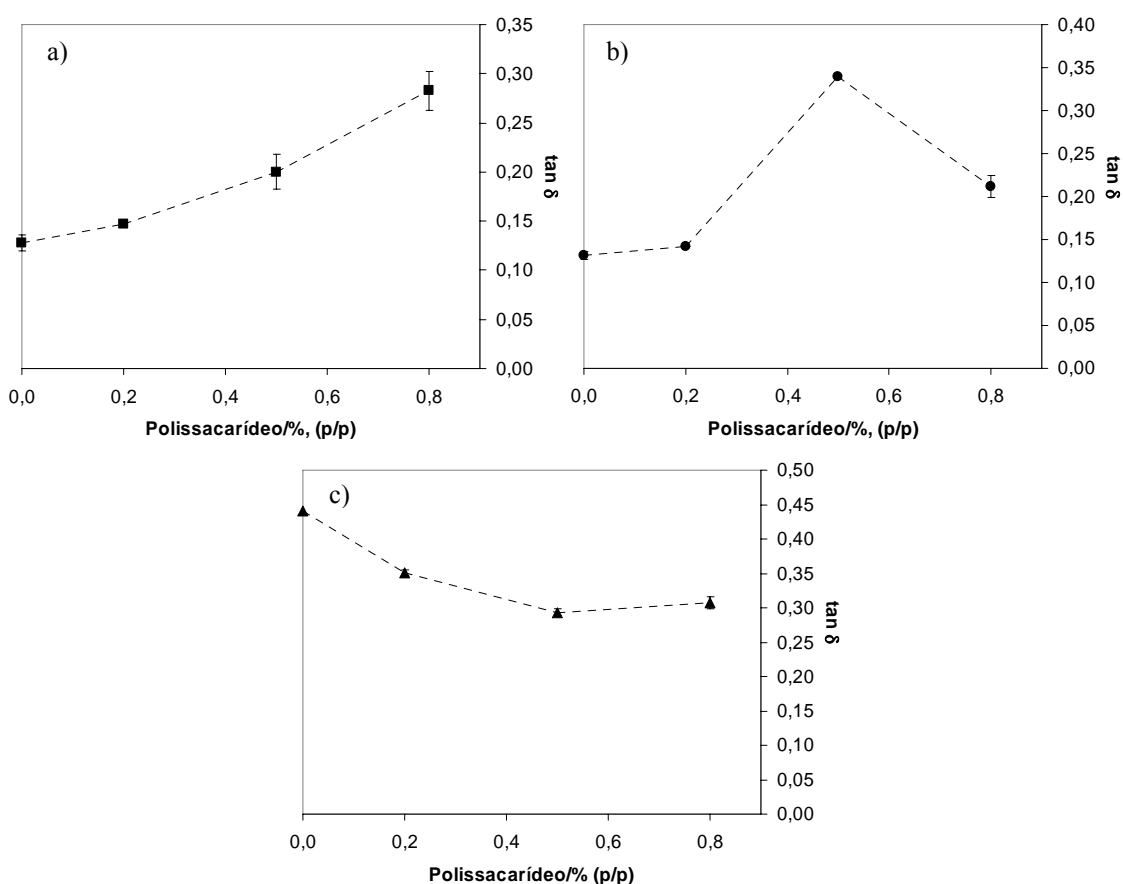
Seguindo o mesmo raciocínio, a figura 4.7 apresenta o comportamento do módulo viscoso ( $G''$ ). O comportamento de  $G''$  na presença de polissacarídeo é muito semelhante ao descrito para  $G'$  nos três tipos de misturas apresentados.

Nas figuras 4.6 e 4.7 apresentam-se, simultaneamente, e para uma melhor comparação, o comportamento de  $G'$  e  $G''$ , respectivamente, para géis exclusivamente proteicos.



**Figura 4.7** Módulo viscoso ( $G''$ ) em função da concentração de polissacarídeo (medido durante o espectro mecânico,  $\omega = 1$  Hz). Média  $\pm$  Intervalo Confiança 95%.  $T = 20$  °C;  $\gamma = 1$  %. a) CPS; b) HT09; c) HT42. — Géis de proteína; ---- Géis de proteína + polissacarídeo.

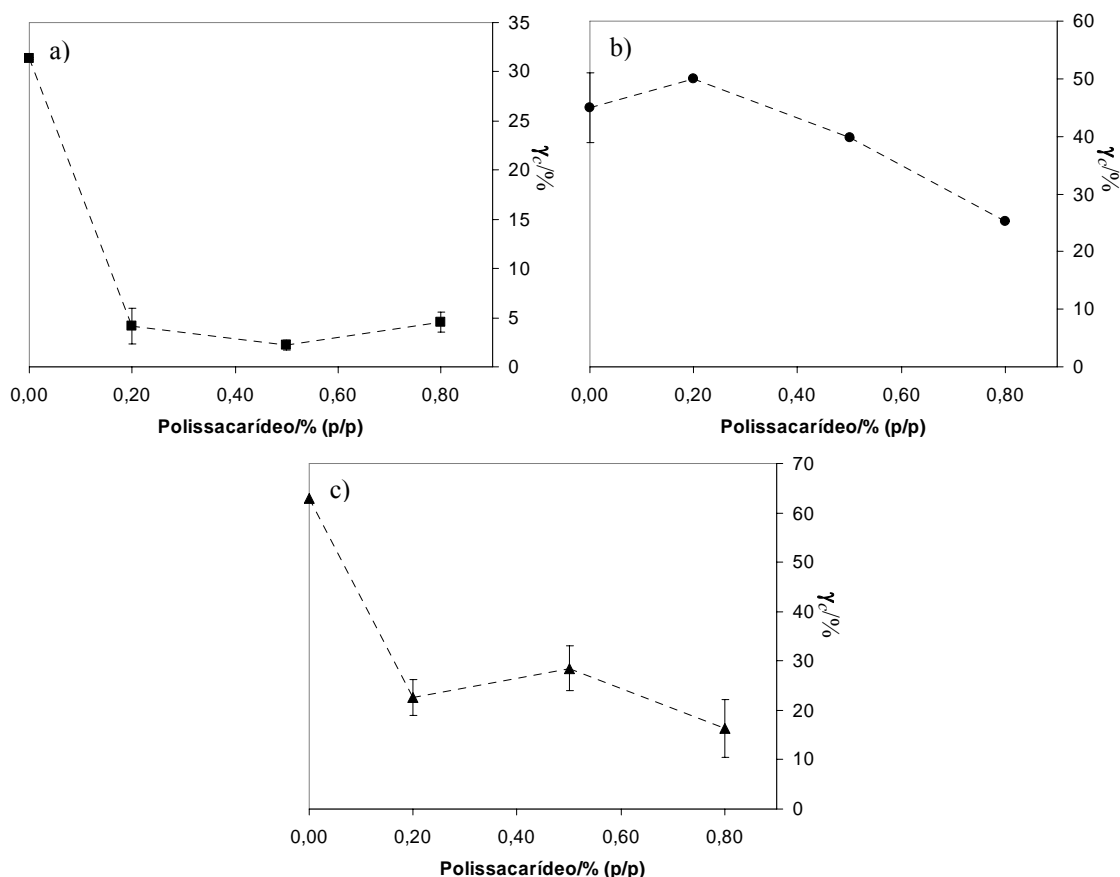
O “carácter” sólido de um gel é tanto maior quanto menor for  $\tan \delta$ . Este parâmetro é apresentado na figura 4.8. Verifica-se que o polissacarídeo diminui o “carácter” sólido dos géis de CPS e HT09 aumentando o dos géis HT42. Dentro da gama de concentração de polissacarídeo estudada,  $\tan \delta$  é uma função sempre crescente para os géis de CPS, apresenta um máximo no caso dos géis HT09 quando a concentração de polissacarídeo é próxima de 0,5% e, no caso dos géis HT42, apresenta um mínimo quando a concentração de polissacarídeo é também próxima de 0,5%.



**Figura 4.8**  $\tan \delta$  em função da concentração de polissacarídeo (durante o espectro mecânico,  $\omega = 1$  Hz). Média  $\pm$  Intervalo Confiança 95%. T = 20 °C;  $\gamma = 1$  %. a) CPS; b) HT09; c) HT42

A deformação máxima a que podemos submeter o gel sem alterar, irreversivelmente, a sua estrutura foi determinada durante o varrimento em deformação efectuado (figura 4.9). Verifica-se que a adição de uma pequena quantidade de polissacarídeo às soluções proteicas de CPS e HT42 diminui a deformação de ruptura do respectivo gel, ou seja,

encurta a zona de viscoelasticidade linear. No entanto, nos géis de HT09, verifica-se um aumento da deformação de ruptura para baixas concentrações de polissacarídeo. Este parâmetro decresce quando aumentamos a concentração de polissacarídeo, mas de uma forma menos acentuada que nos outros géis estudados.



**Figura 4.9** Deformação de ruptura em função da concentração de goma de tara. Média  $\pm$  Intervalo Confiança 95%. T = 20 °C;  $\omega$  = 1 Hz. a) CPS; b) HT09; c) HT42

Depois da análise do efeito da adição de polissacarídeo nas propriedades viscoelásticas dos géis de natureza proteica, surge uma questão geral: o porquê das diferenças observadas?

O polissacarídeo, por si só, contribui de uma forma negligenciável para as propriedades viscoelásticas dos géis. As diferenças observadas nos parâmetros apresentados no comportamento de gelificação e nos espectros mecânicos reflectem, em primeiro lugar, alterações nos mecanismos de agregação e estruturação das moléculas proteicas, induzidas pela presença de polissacarídeos, tal como já foi referido por Gonçalves *et al.* (2004b).

O polissacarídeo tem um efeito comum nos três tipos de misturas: a aceleração da gelificação aumenta quando a concentração de polissacarídeo é de 0,2% (figura 4.2). Um comportamento semelhante foi também observado na gelificação de proteínas de soro de leite quando misturadas com galactomananos de *Cassia javanica* (Gonçalves *et al.* 2004b). No entanto, o comportamento deste parâmetro de gelificação diverge para concentrações de polissacarídeo mais altas. No estudo apontado, propõe-se a hipótese de ocorrer separação de fases do tipo líquido-líquido, em simultâneo com o fenómeno de agregação proteica, até ao momento da gelificação, altura em que a separação de fases é “congelada”.

Owen e Jones (1998) apontam a conectividade da fase gelificante como o factor vital no controlo dos módulos elástico e viscoso. Assim, pequenas diferenças na composição da amostra, levam a velocidades de separação de fases ligeiramente diferentes que induzem alterações qualitativas na morfologia do gel que, por seu lado, originam grandes alterações nas propriedades reológicas dos géis mistos (Owen e Jones 1998).

Relativamente a cada um dos tipos de misturas, a determinada altura, o grau de separação de fases dependerá, essencialmente, da viscosidade do meio e do volume de fase ocupado pela fase não gelificante (Gonçalves *et al.* 2004b). Comparando os três tipos de mistura deste trabalho, o grau de separação entre as duas fases dependerá do tipo de proteína e/ou péptidos presentes nas misturas (a fracção de péptidos aumenta com o grau de hidrólise) e, também, da concentração total de material proteico, que é também diferente nos três casos (CPS 5%, HT09 9% e HT42 17%).

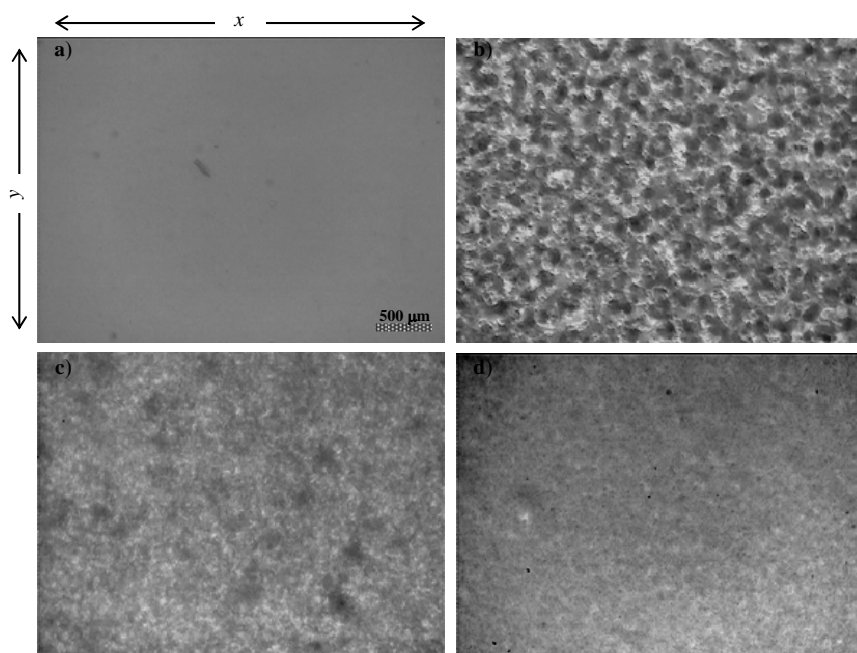
#### **4.3.3 Microestrutura**

Numa tentativa de avaliar o fenómeno de separação de fases, o estudo microscópico dos géis foi a estratégia escolhida. Para tal, numa primeira fase, optou-se por um estéreo-microscópio óptico. Neste tipo de equipamento a observação bidimensional do gel permite efectuar um primeiro esboço do grau de separação das duas fases (figuras 4.10, 4.12 e 4.14). No entanto, um estudo mais profundo e tridimensional da matriz gelificada só é possível recorrendo a um microscópio confocal de varrimento laser (figuras 4.11 4.13 e 4.15).

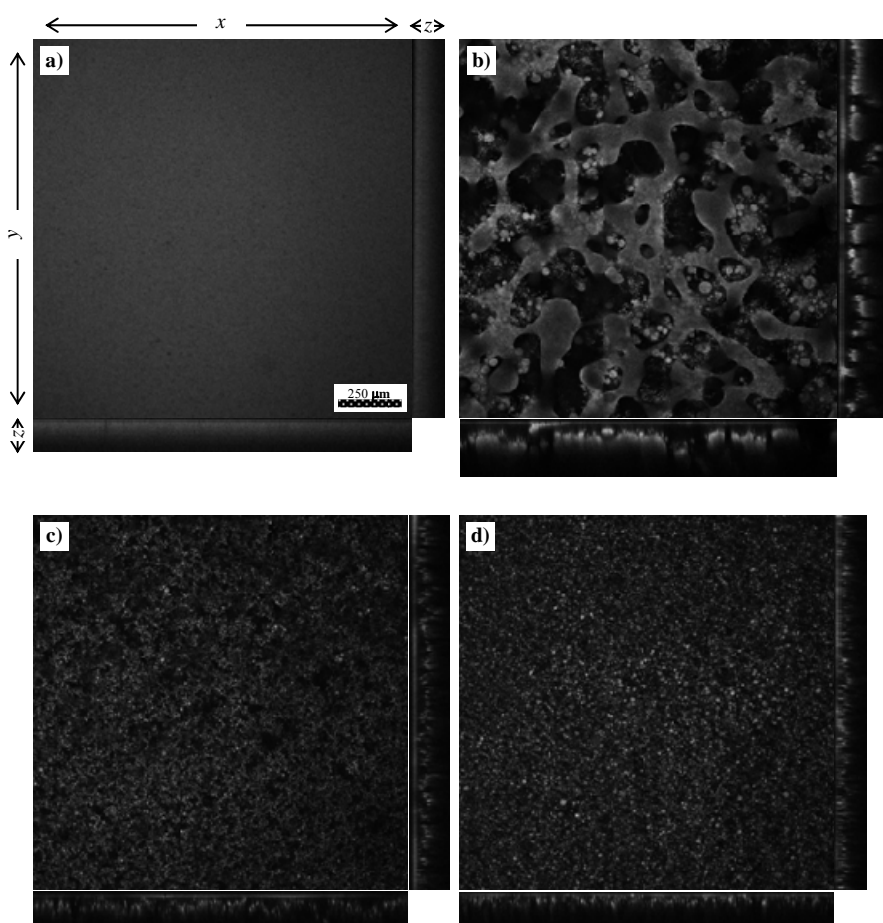
Nas imagens seguintes é possível observar que na presença de polissacarídeo ocorre uma separação, mais ou menos pronunciada, das fases de proteína e polissacarídeo. Nas figuras do estéreo-microscópio óptico (figuras 4.10, 4.12 e 4.14) a fase proteica

encontra-se nas zonas mais escuras e a fase polissacarídica nas zonas mais claras. Neste estéreo-microscópio óptico, as imagens traduzem a luz transmitida depois da luz branca, emitida por uma lâmpada convencional, atravessar toda a espessura do gel. O contrário acontece nas imagens do microscópio confocal de varrimento laser (figuras 4.11 4.13 e 4.15), onde a fase mais clara corresponde à fase proteica pois o corante utilizado (RITC), que emite radiação com comprimento de onda entre 553 e 678 nm, quando excitada a 543 nm, encontra-se ligado de forma não covalente ao material proteico. Nestas imagens, de forma a ser possível observar a parte central do gel, o corte  $xy$  apresentado é intermédio relativamente ao eixo dos  $zz$ .

Nas figuras 4.10 e 4.11, são apresentados fotografias da microestrutura dos géis de CPS. Verifica-se que, quando a concentração de polissacarídeo é de 0,2%, a separação de fases é bastante mais pronunciada do que para concentrações de polissacarídeo superiores, provavelmente, devido à inferior viscosidade do meio que facilita a difusão das moléculas (figuras 4.10b e 4.11b). A separação de fases que ocorre neste sistema leva à formação de uma curiosa estrutura onde pequenas estruturas proteicas gelificadas de forma esférica ( $\varnothing < 30 \mu\text{m}$ ) coexistem com uma rede proteica gelificada irregular, principal contribuinte para o valor dos módulos elástico e viscoso. Para concentrações de polissacarídeo superiores, a microestrutura dos géis é, aparentemente, mais regular, o que faria prever uma maior conectividade da rede proteica e consequente aumento dos módulos. No entanto, os valores de  $G'$  e  $G''$  são bastante inferiores aos observados para o gel CPS/2, o que leva a concluir que a conectividade entre os pequenos agregados proteicos formados (na ordem do  $\mu\text{m}$ ) está comprometida pela presença da fase polissacarídica. De referir, ainda, que estes dois géis apresentam microestruturas semelhantes. Este facto, provavelmente, explica a semelhança dos seus módulos  $G'$  e  $G''$  (figura 4.6a e 4.7a) e restantes propriedades reológicas.

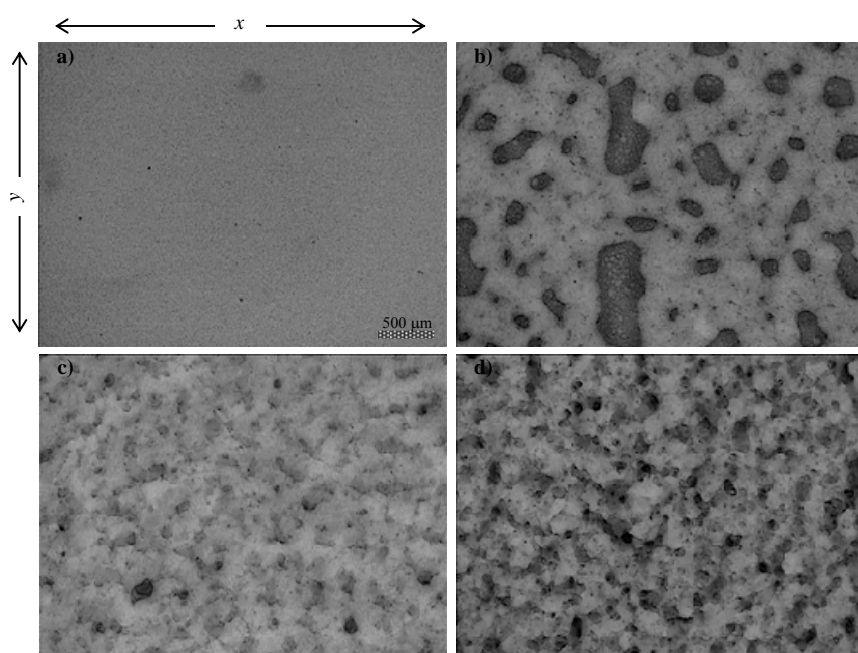


**Figura 4.10** Imagens obtidas recorrendo a um estéreo-microscópio óptico de géis de CPS (5% p/p proteína). a) sem polissacarídeo; b) 0,2% polissacarídeo; c) 0,5% polissacarídeo; d) 0,8% polissacarídeo

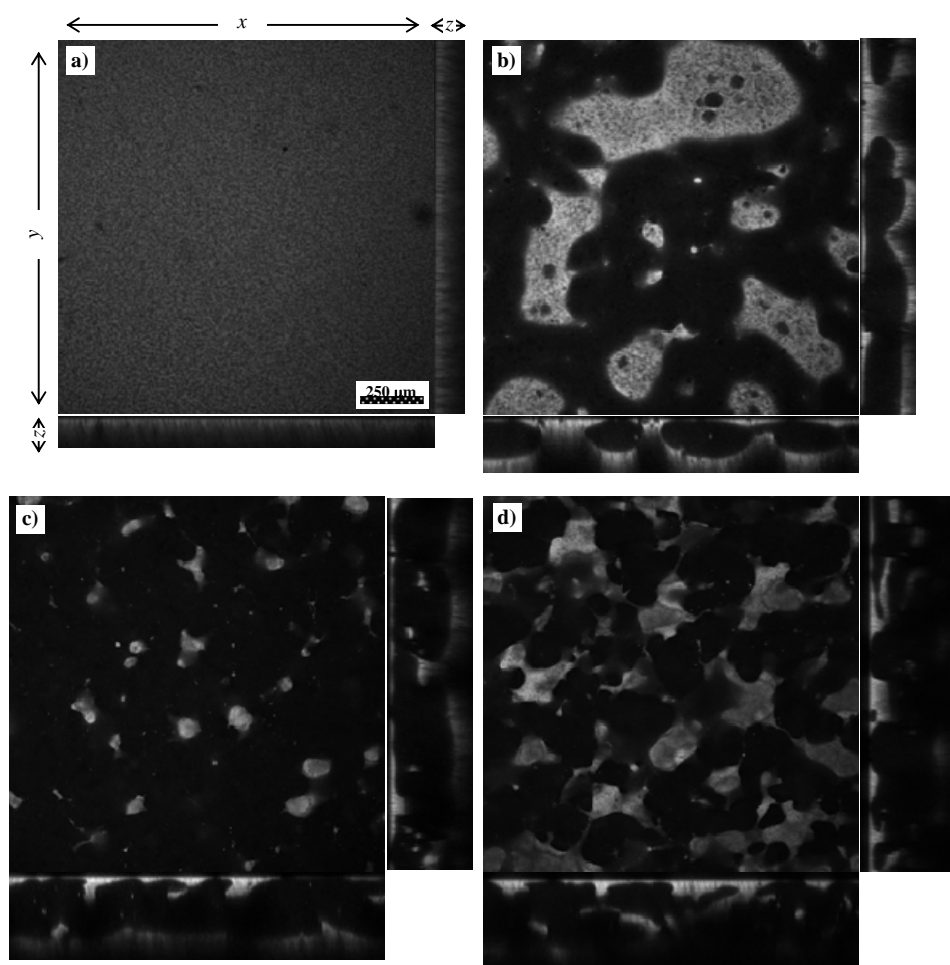


**Figura 4.11** Imagens obtidas recorrendo a um microscópio confocal de géis de CPS (5% p/p proteína). a) sem polissacarídeo; b) 0,2% polissacarídeo; c) 0,5% polissacarídeo; d) 0,8% polissacarídeo

Nas figuras 4.12 e 4.13 são apresentados os géis de HT09. A observação da figura 4.12 revela uma aparente maior separação de fases para o gel HT09/2, no entanto, a figura 4.13 revela alguma continuidade da rede proteica ao longo do eixo  $z$ , o que não acontece no gel HT09/5 (figura 4.13c) e talvez seja esta a razão para o decréscimo dos módulos  $G'$  e  $G''$  observados nas figura 4.6b e 4.7b. No gel HT09/8 (figuras 4.12d e 4.13d) a continuidade de rede proteica aumenta, como pode ser observado nas várias perspectivas. O aumento muito acentuado dos módulos neste gel poderá ser explicado por uma acentuada concentração da fase proteica, resultante da separação de fases, sem perda da respectiva conectividade, no entanto, não deixa de ser um resultado surpreendente. A possibilidade de, com as imagens do microscópio confocal, conseguir observar os géis ao longo do eixo dos  $zz$ , revela-se imprescindível na compreensão do mecanismo de separação de fases e da forma como este fenómeno determina o comportamento reológico dos géis. A figura 4.13 é disso um exemplo paradigmático. De salientar ainda que, nas amostras onde a separação de fases é relativamente rápida, como nas misturas das figuras 4.12 e 4.13, o tempo de secagem necessário durante a preparação das lâminas para a observação microscópica (ver secção 4.2.2.4) pode ser suficientemente longo para que as amostras observada se encontrem numa etapa mais avançada do processo de separação de fases, relativamente, às amostras correspondentes analisadas no reómetro.



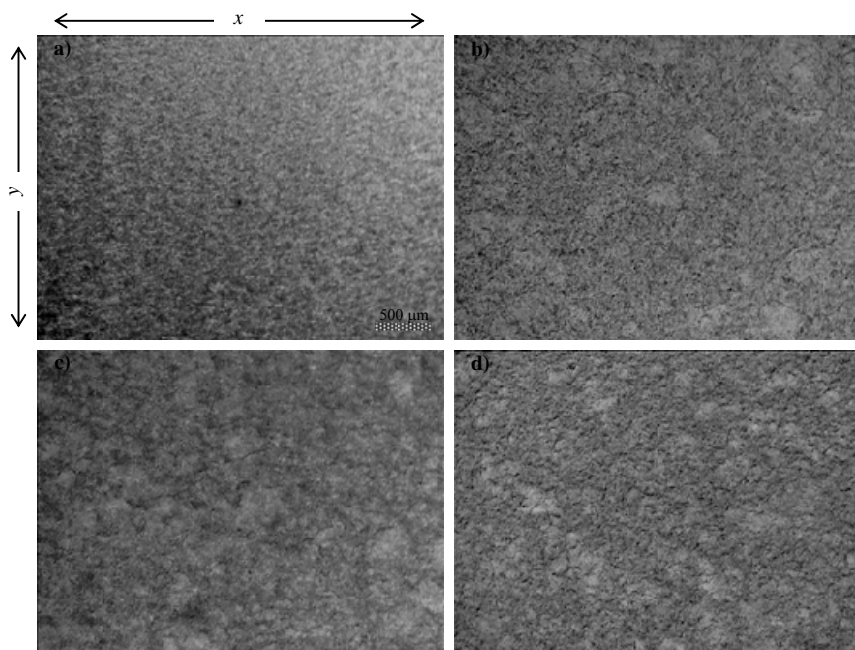
**Figura 4.12** Imagens obtidas recorrendo a um estéreo-microscópio óptico de géis de HT09 (9% p/p proteína). a) sem polissacarídeo; b) 0,2% polissacarídeo; c) 0,5% polissacarídeo; d) 0,8% polissacarídeo



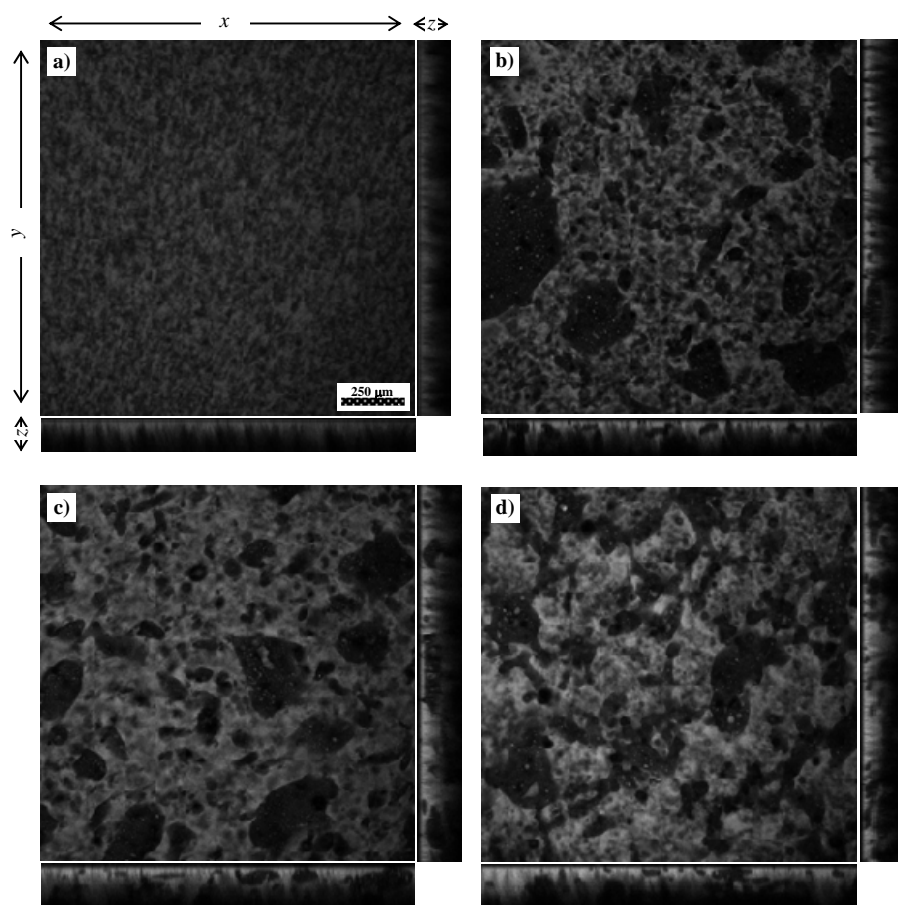
**Figura 4.13** Imagens obtidas recorrendo a um microscópio confocal de géis de HT09 (9% p/p proteína). a) sem polissacarídeo; b) 0,2% polissacarídeo; c) 0,5% polissacarídeo; d) 0,8% polissacarídeo

Nas figuras 4.14 e 4.15 são apresentados os géis de HT42. Os géis mistos deste hidrolisado têm uma aparência esponjosa, com uma aparente boa conectividade da rede tridimensional proteica. Nestas amostras, a concentração de material proteico é maior comparativamente às amostras anteriores. É também diferente a natureza do material proteico, muito mais rica em pequenos péptidos de vários tamanhos (apenas ~ 23% da  $\beta$ -lactoglobulina permanece intacta). Apesar do referido no capítulo 3 relativamente ao papel dos péptidos libertados durante a hidrólise na estabilização da  $\beta$ -lactoglobulina, estes factores podem estar na base da manutenção da conectividade da rede proteica apesar da notória separação de fases. O aumento da concentração proteica na fase gelificante, poderá explicar o aumento significativo dos módulos  $G'$  e  $G''$  observado nas imagens 4.6c e 4.7c.





**Figura 4.14** Imagens obtidas recorrendo a um estéreo-microscópio óptico de géis de HT42 (17% p/p proteína). a) sem polissacarídeo; b) 0,2% polissacarídeo; c) 0,5% polissacarídeo; d) 0,8% polissacarídeo

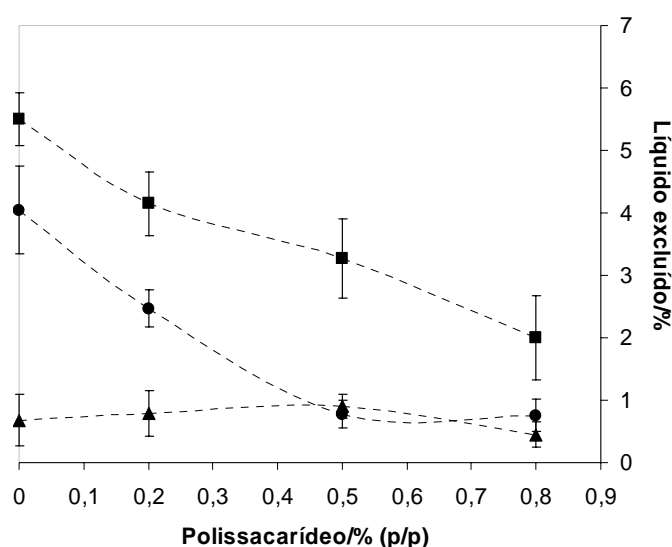


**Figura 4.15** Imagens obtidas recorrendo a um microscópio confocal de géis de HT42 (17% p/p proteína). a) sem polissacarídeo; b) 0,2% polissacarídeo; c) 0,5% polissacarídeo; d) 0,8% polissacarídeo

Ao comparar os géis CPS/0 HT09/0 e HT42/0 (géis sem polissacarídeo), é possível verificar que a aparência dos géis se vai tornando cada vez mais grosseira e porosa, à medida que o grau de hidrólise aumenta. Apesar da concentração proteica ser diferente, e a comparação por isso condicionada, parece que a presença de péptidos, resultantes da hidrólise, favorece a formação de agregados maiores, fenómeno já referido por vários autores, conforme discutido na secção 2.3 (Huang *et al.* 1999; Otte *et al.* 1996; Otte *et al.* 2000).

#### 4.3.4 Sinérese

Durante o processo de maturação do gel, ocorre exclusão de parte da água existente no momento da gelificação. Os resultados obtidos mostram que a presença de polissacarídeo diminui significativamente a quantidade de água que é excluída nos géis de CPS e HT09. Durante a gelificação do hidrolisado HT42 pouca água é excluída (< 1%) e o polissacarídeo não tem efeito significativo neste parâmetro.



**Figura 4.16** Sinérese, expressa em % de líquido excluído durante o processo de gelificação. Média  $\pm$  Intervalo Confiança 95%  
CPS ■, HT09 ●, HT42 ▲

Mais uma vez, a comparação entre os três tipos de preparados deve ser feita tendo em consideração que a concentração de material proteico é diferente. Alguns autores apontam o aumento da porosidade da rede proteica como a principal razão para a perda de capacidade de retenção de água do gel (Huang *et al.* 1999; Otte *et al.* 2000). Neste

estudo, o referido efeito da porosidade na sinérese, parece ser anulado pelo aumento da concentração proteica dos géis mais porosos.

#### 4.4 Algumas conclusões

A hidrólise das proteínas de soro parece favorecer a agregação proteica, conduzindo à formação de um gel com estrutura porosa.

A adição de galactomananos aos diversos ingredientes proteicos conduz à separação de fases do tipo segregativo. Este fenómeno, quando é simultâneo à gelificação por aquecimento, condiciona a estrutura do gel final e, consequentemente, os módulos, elástico e viscoso, e restantes propriedades reológicas. Se, por um lado, o aumento da concentração da fase proteica conduz ao aumento da rigidez da estrutura, por outro lado, o aumento do volume da fase polissacarídica diminui a conectividade da rede proteica, o que reduz o valor dos módulos. É, essencialmente, o balanço destes dois processos que conduz a um comportamento, muitas vezes não monótono, da relação  $G'$  vs % polissacarídeo ou  $G''$  vs % polissacarídeo.

A diversidade de microestruturas mistas que podem ser formadas, manipulando a concentração e o grau de hidrólise das proteínas e, essencialmente, a concentração de polissacarídeo, tem especial interesse no desenvolvimento de novos alimentos com novas características organolépticas.

#### 4.5 Bibliografia

- Coimbra MA, Delgadillo I, Waldron KW, Selvendran RR (1996) Isolation and analysis of cell wall polymers from olive oil pulp. In: Linskens HF, Jackson JF (eds) *Modern methods of plant analysis*, vol 17. Springer, Berlin-Heidelberg, pp 19-44
- Doublier JL, Launay B (1981) Rheology of galactomannan solutions: comparative study of guar gum and locust bean gum. *Journal of Texture Studies* 12:151-172
- Gaisford SE, Harding SE, Mitchell JR, Bradley TD (1986) A comparison between the hot and cold water soluble fractions of two locust bean gum samples. *Carbohydrate Polymers* 6:423-442
- Gonçalves MP, Sittikijyothin W, da Silva MV, Lefebvre J (2004a) A study of the effect of locust bean gum on the rheological behaviour and microstructure of a  $\beta$ -lactoglobulin gel at pH 7. *Rheologica Acta* no prelo

- Gonçalves MP, Torres D, Andrade CT, Azero EG, Lefebvre J (2004b) Rheological study of the effect of *Cassia javanica* galactomannans on the heat-set gelation of a whey protein isolate at pH 7. *Food Hydrocolloids* 18:181-189
- Huang XL, Catignani GL, Swaisgood HE (1999) Modification of rheological properties of whey protein isolates by limited proteolysis. *Nahrung* 43:79-85
- Otte J, Ju ZY, Kilara A (1996) Protease-induced aggregation and gelation of whey proteins. *Journal of Food Science* 61:911-923
- Otte J, Lomholt SB, Ipsen RH, Qvist KB (2000) Effect of partial hydrolysis with an immobilized proteinase on thermal gelation properties of  $\beta$ -lactoglobulin B. *Journal of Dairy Research* 67:597-608
- Owen AJ, Jones RAL (1998) Rheology of a simultaneously phase-separating and gelling biopolymer mixture. *Macromolecules* 31:7336-7339
- Sittikijyothin W, Torres D, Gonçalves MP (2005) Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers* 59:339-350

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de enzimas proteolíticas possibilita a obtenção de hidrolisados proteicos de alta qualidade. A manipulação das condições do processo de hidrólise, a grande variedade de enzimas existentes e a sua possível combinação, permite, potencialmente, obter hidrolisados com propriedades, funcionais, nutricionais e/ou biológicas ajustadas a determinada aplicação desejada.

No prosseguimento do presente estudo será útil abordar o aspecto biológico e nutricional dos hidrolisados produzidos por acção da tripsina. Para tal, será necessário avaliar as várias propriedades biológicas apontadas aos hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro (descritas no capítulo 1) e, de forma coordenada, recorrer a técnicas de separação que possibilitarão concentrar ou mesmo isolar os péptidos mais interessantes do ponto de vista biológico.

A hidrólise enzimática diminui de forma muito significativa a capacidade de gelificação das proteínas de soro, provavelmente, devido à libertação de péptidos que estabilizam a estrutura nativa das proteínas ainda existentes (principalmente a  $\beta$ -lactoglobulina) e da redução de locais de interacção, covalente ou hidrofóbica, efectivos para o estabelecimento da rede elástica tridimensional que caracteriza um gel.

A hidrólise enzimática permite, portanto, regular as propriedades de gelificação de preparados proteicos à base de soro de leite, favorecendo a aplicação destes ingredientes em alimentos líquidos ou semi-sólidos com alto teor em proteínas, com especial interesse naqueles que sofrem processamento térmico (ex. bebidas funcionais com alto teor proteico, molhos para culinária, sobremesas lácteas funcionais).

A adição de galactomananos a suspensões proteicas e/ou peptídicas induz, invariavelmente, uma separação de fases do tipo segregativo. Quando os processos de separação de fases e gelificação ocorrem simultaneamente a microestrutura mista do gel final pode ter várias morfologias dependentes, essencialmente, da velocidade relativa dos dois processos. Este aspecto pode ser aproveitado para a formulação de alimentos com texturas variadas. Na prossecução deste trabalho será útil aplicar estes géis mistos

em formulações alimentares e avaliar as resultantes características organolépticas, recorrendo à análise sensorial.

As propriedades reológicas dos géis mistos são marcadas pela conectividade da fase proteica no momento da gelificação. Para o estudo mais aprofundado destes aspectos será necessário uma melhor avaliação do fenómeno de separação de fases, se possível de forma quantitativa, através do estudo das imagens microscópicas. Neste contexto, será interessante o estudo da influência do tempo de gelificação (variando a velocidade de aquecimento) no fenómeno de separação de fases (avaliando o volume de cada uma das fases e a conectividade da fase gel) e nas propriedades reológicas dos géis finais.